



UNIVERSITAS INDONESIA

**KARAKTERISASI PERTUMBUHAN DAN EKSPRESI
PROTEIN *NON STRUCTURAL* 1 (NS1) EMPAT SEROTIPE
VIRUS DENGUE PADA ENAM GALUR SEL**

SKRIPSI

**R. INDAH KENDARSARI
0706163344**

**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
DEPARTEMEN BIOLOGI
DEPOK
NOVEMBER 2011**



UNIVERSITAS INDONESIA

**KARAKTERISASI PERTUMBUHAN DAN EKSPRESI
PROTEIN *NON STRUCTURAL* 1 (NS1) EMPAT SEROTIPE
VIRUS DENGUE PADA ENAM GALUR SEL**

SKRIPSI

Diajukan sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Sains

**R. INDAH KENDARSARI
0706163344**

**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
DEPARTEMEN BIOLOGI
DEPOK
NOVEMBER 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 : R. Indah Kendarsari

NPM : 0706163344

Tanda Tangan : 

Tanggal : 28 November 2011

HALAMAN PENGESAHAN

Skripsi ini diajukan oleh :

Nama : R. Indah Kendarsari
NPM : 0706163344
Program Studi : Biologi
Judul Skripsi : Karakterisasi Pertumbuhan dan Ekspresi Protein *Non Structural 1(NS1)* Empat Serotipe Virus Dengue pada Enam Galur Sel

Telah berhasil dipertahankan di hadapan Dewan Penguji dan diterima sebagai bagian persyaratan yang diperlukan untuk memperoleh gelar Sarjana Sains pada Program Studi Biologi S1 Reguler, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Indonesia.


DEWAN PENGUJI

Pembimbing I : Tedjo Sasmono, Ph.D.



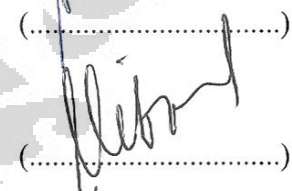
(.....)

Pembimbing II : Dr. Anom Bowolaksono, M.Sc.



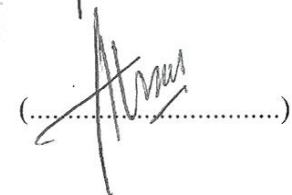
(.....)

Penguji I : Dr. Wibowo Mangunwardoyo, M.Sc.



(.....)

Penguji II : Dr. Abinawanto



(.....)

Ditetapkan di : Depok

Tanggal : 28 November 2011

KATA PENGANTAR

Puji syukur Penulis panjatkan kepada Allah SWT atas segala limpahan rahmat dan hidayah-Nya, serta junjungan Nabi besar Muhammad SAW, sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi ini. Penelitian dan penulisan skripsi ini dilakukan sebagai satu syarat untuk mencapai gelar Sarjana Sains Departemen Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Indonesia (FMIPA UI). Penulis banyak mendapat bimbingan dan bantuan dari berbagai pihak dalam penyelesaian skripsi ini. Oleh karena itu, pada kesempatan ini dengan kerendahan hati disertai rasa tulus ikhlas, penulis menyampaikan ucapan terima kasih kepada:

1. Tedjo Sasmono, Ph.D. dan Dr. Anom Bowolaksono, M.Sc. selaku Pembimbing I dan II yang telah sabar memberikan bimbingan, pengalaman, nasihat, ilmu, waktu, serta saran dan kritik yang sangat bermanfaat kepada Penulis selama penelitian dan penulisan skripsi ini,
2. Dr. Wibowo Mangunwardoyo, M.Sc. dan Dr. Abinawanto selaku Penguji I dan II yang telah memberikan saran dan perbaikan yang sangat membangun demi kemajuan Penulis dalam penelitian dan penulisan skripsi ini.
3. Wellyzar Sjamsuridzal, Ph.D. selaku Penasehat Akademis atas dukungan dan bimbingan yang diberikan kepada penulis. Dr.rer.nat. Mufti P. Patria, M.Sc. selaku Ketua Departemen Biologi, Dra. Nining Betawati Prihartini, M.Sc. selaku Sekretaris Departemen Biologi, dan Dra. Titi Soedjiarti, S.U. selaku Koordinator Pendidikan yang telah membantu dan memfasilitasi terselesaikannya skripsi ini. Dra. Retno Lestari, M.Si yang banyak memberikan motivasi dan bantuan kepada penulis sejak masuk Laboratorium Genetika hingga selesainya skripsi ini.
4. Prof. dr. Sangkot Marzuki, A.M. Ph.D. D.Sc. dan Prof. dr. Herawati Sudoyo, Ph.D. yang telah mengizinkan Penulis untuk melakukan penelitian di Lembaga Biologi Molekul Eijkman, khususnya Laboratorium Novartis-Eijkman-Hassanudin *Clinical Initiative* (NEHCRI). Terima kasih sebesar-besarnya kepada Dra. Rintis Noviyanti, Ph.D., Mas Yohan, Mbak Yuli, dan

seluruh peneliti Lembaga Molekul Eijkman atas ilmu, pengalaman, dan kebersamaan yang sangat berkesan kepada Penulis.

5. Kedua orang tua, adik, dan seluruh keluarga besar yang selalu memberikan doa restu, kasih sayang, dan dukungan material maupun moral yang tak akan terbalas dengan apapun kepada Penulis hingga selesainya skripsi ini.
6. Seluruh sivitas akademis dan nonakademis Departemen Biologi FMIPA UI, khususnya kepada Mbak Asri Martini, Mbak Ida dan Ibu Rusmalina, yang banyak memberikan pengarahan dan bantuan kepada Penulis.
7. Januar Hakam yang selalu sabar memberikan motivasi, saran dan kritik yang membangun, serta keceriaan pada Penulis. Teman-teman terbaik Penulis Tami, Fajar, Kresna, Bayu, Eja, Karno, Kimbod, Lulu, Tewe, beserta kawan-kawan BLOSSOM lainnya yang telah memberikan dukungan dan kebersamaan yang sangat berkesan kepada Penulis.
8. Semua pihak yang tidak dapat disebutkan satu per satu yang telah banyak membantu Penulis dalam penyelesaian skripsi ini.

Semoga Allah SWT memberikan imbalan yang berlipat ganda kepada mereka atas segala amal kebaikan dan ketulusannya. Penulis menyadari bahwa penelitian dan penyusunan skripsi ini masih jauh dari kesempurnaan. Oleh karena itu, Penulis akan senang hati menerima segala kritik dan saran demi tercapainya hasil yang lebih baik. Dengan segala kerendahan hati, Penulis berharap semoga skripsi ini dapat bermanfaat bagi seluruh pihak dan bagi perkembangan ilmu pengetahuan pada umumnya dan ilmu Biologi pada khususnya.

Depok, 28 November 2011

Penulis

**HALAMAN PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI
KARYA ILMIAH UNTUK KEPENTINGAN AKADEMIS**

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

Nama : R. Indah Kendarsari
NPM : 0706163344
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:

Karakterisasi Pertumbuhan dan Ekspresi Protein *Non Structural 1* (NS1) Empat Serotipe Virus Dengue pada Enam Galur Sel.

beserta perangkat yang ada (jika diperlukan). Dengan Hak Bebas Royalti Noneksklusif ini Universitas Indonesia berhak menyimpan, mengalihmedia/format-kan, mengelola dalam bentuk pangkalan data (*database*), merawat, dan memublikasikan karya ilmiah saya selama tetap mencantumkan nama saya sebagai penulis/pencipta dan sebagai pemilik Hak Cipta.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya.

Dibuat di : Depok
Pada tanggal : 28 November 2011
Yang menyatakan



(R. Indah Kendarsari)

ABSTRAK

Nama : R. Indah Kendarsari
Program Studi : Biologi
Judul : Karakterisasi Pertumbuhan dan Ekspresi Protein *Non Structural 1* (NS1) Empat Serotipe Virus Dengue pada Enam Galur Sel

Penelitian dengue secara *in vitro* banyak dilakukan untuk mengetahui mekanisme pasti patogenesis infeksi dengue. Namun, sedikitnya informasi mengenai karakter pertumbuhan virus dengue pada galur sel model menjadi salah satu faktor pembatas. Karakterisasi pertumbuhan kinetik dilakukan untuk mengetahui dengan melihat karakter pertumbuhan kinetik virus dengue pada galur sel C6/36, Vero76, MDCK, 293, HepG2, dan A549. Parameter pertumbuhan virus dengue pada tiap sel diketahui dengan melihat kecepatan replikasi, ekspresi protein NS1, dan deteksi genom virus dengue. Hasil uji kinetik menunjukkan adanya perbedaan profil pertumbuhan tiap serotipe virus dengue pada tiap galur sel, dengan pertumbuhan relatif lebih tinggi pada sel A549 dibandingkan dengan galur sel lainnya. Hasil uji ELISA menunjukkan ekspresi protein NS1 pada sel A549 meningkat seiring peningkatan titer virus. Keberadaan RNA genom virus dengue pada sel A549 dikonfirmasi menggunakan RT-PCR. Dengan demikian, keseluruhan hasil penelitian ini menunjukkan virus dengue mampu tumbuh dengan baik pada galur sel A549, sehingga dapat digunakan sebagai galur sel mamalia alternatif untuk propagasi dan penelitian infeksi virus dengue lebih lanjut.

Kata kunci : ELISA, galur sel A549, NS1, pertumbuhan kinetik, RT-PCR, virus dengue.

xii + 110 halaman; 17 gambar; 16 lampiran; 6 tabel
Daftar Referensi: 83 (1968--2010)

ABSTRACT

Name : R. Indah Kendarsari
Study Program : Biology
Title : Growth Characteristics and Non Structural Protein 1 (NS1)
Expression of Four Dengue Virus Serotypes in Six Different
Cell Lines

In vitro dengue research has been routinely used to study the pathogenesis of dengue infection. The little information about the growth characteristics of dengue viruses in various cell lines model has become the limiting factor of dengue research. Dengue virus growth characterization was conducted to determine the growth kinetics of dengue viruses in several cell lines *i.e.* in C6/36, Vero76, MDCK, 293, HepG2, and A549 cell lines. Growth characteristics of dengue virus in each cell were measured by looking at the rate of replication, NS1 protein expression, and detection of dengue virus genome. The replication kinetic assay indicated the difference growth characteristics of each serotype of dengue virus in each cell line, with the relatively higher growth was observed in A549 cell line compared to other cell lines. ELISA result showed an increased expression of NS1 protein in A549 cell in parallel with increasing viral titer. The presence of dengue virus RNA genome in A549 cells was confirmed using RT-PCR assay. This study observed the ability of dengue viruses to grow well in A549 cell line and this cell line could be used as an alternative mammalian cell line for propagation and further study of dengue virus infection.

Keywords : A549 cell line, dengue virus, ELISA, growth kinetics, NS1, RT-PCR.

xii + 110 pages; 16 appendices; 17 pictures; 6 tables
Bibliography: 83 (1968--2010)

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS	ii
HALAMAN PENGESAHAN	iii
KATA PENGANTAR	iv
HALAMAN PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI KARYA ILMIAH UNTUK KEPENTINGAN AKADEMIS	vi
ABSTRAK	vii
ABSTRACT	viii
DAFTAR ISI	ix
DAFTAR GAMBAR	xi
DAFTAR TABEL	xii
DAFTAR LAMPIRAN	xii
1. PENDAHULUAN	1
2. TINJAUAN PUSTAKA	5
2.1. Virus Dengue	5
2.1.1. Klasifikasi, Struktur dan Genom Virus Dengue	5
2.1.2. Protein NS1 Virus Dengue	8
2.1.3. Hubungan Evolusi Empat Serotipe Virus Dengue	9
2.1.4. Siklus Hidup Virus Dengue	10
2.2. Patogenesis dan Virulensi Virus Dengue	11
2.3. Lokalisasi Virus Dengue pada Jaringan atau Sel	13
2.4. Metode Deteksi Infeksi Virus Dengue	13
2.5.1. Deteksi Molekuler	14
2.5.2. Deteksi Serologis	15
2.5.3. Isolasi dan Karakterisasi Virus Dengue	17
2.5. Teknik Kultur Sel	18
2.6. Galur Sel C6/36, BHK21, Vero76, MDCK, 293, HepG2 dan A549	20
2.7. Uji Pertumbuhan Kinetik	22
2.6. Metode Pengukuran Titer Virus Dengue	24
3. METODE PENELITIAN	26
3.1. Lokasi dan Waktu Penelitian	26
3.2. Alat	26
3.3. Bahan	27
3.3.1. Sampel	27
3.3.2. Medium	27
3.3.3. Bahan Lain	28
3.4. Cara Kerja	28
3.4.1. Persiapan Galur Sel (C6/36, BHK21, Vero76, MDCK, 293, HepG2 dan A549)	28
3.4.1.1. Pencairan Stok Sel Beku (<i>Thawing</i>)	28

3.4.1.2.	Subkultur	29
3.4.1.3.	Pembuatan Stok Sel Beku (<i>Freezing</i>).....	30
3.4.2.	Uji Pertumbuhan Kinetik Virus Dengue dalam Enam Galur Sel.....	30
3.4.3.	<i>Enzyme-linked Immunoabsorbant Assay</i> (ELISA) untuk Deteksi Protein NS1	32
3.4.4.	<i>Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction</i> (RT-PCR).....	33
3.4.4.1.	Ekstraksi RNA dari Supernatan Virus Dengue ...	33
3.4.4.2.	<i>Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction</i> (RT-PCR) untuk Deteksi Virus Dengue	34
3.4.4.3.	Elektroforesis Gel Agarosa.....	36
3.4.5.	Pengukuran Titer Virus dengan <i>Plaque Assay</i>	37
4.	HASIL DAN PEMBAHASAN	40
4.1.	Analisis Kultur Sel, Propagasi Virus, dan Penghitungan Titer Virus	40
4.1.1.	Analisis Kultur Sel	40
4.1.2.	Analisis Propagasi Virus Dengue pada Sel C6/36	43
4.1.3.	Analisis Pengukuran Titer Virus Dengue dengan <i>Plaque Assay</i>	44
4.2.	Analisis Hasil Uji Pertumbuhan Kinetik Empat Serotipe Virus Dengue pada Enam Galur Sel.....	47
4.2.1.	Analisis Variabel Uji Kinetik	47
4.2.2.	Analisis Profil Pertumbuhan dan Statistik Empat Serotipe Virus Dengue.....	49
4.2.3.	Analisis Galur Sel Vero76 dan A549 sebagai Sel Mamalia Alternatif	53
4.3.	Ekspresi Protein NS1 pada Galur Sel Vero76 dan A549	55
4.4.	Analisis Deteksi Genom Virus Dengue pada Sel Vero76 dan A549	59
4.5.	Analisis Hasil Uji Kinetik Konfirmasi pada Sel HepG2 dan MDCK	63
5.	KESIMPULAN DAN SARAN	66
5.1.	Kesimpulan	66
5.2.	Saran	66
	DAFTAR REFERENSI	67
	LAMPIRAN.....	76

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1.1(1).	Struktur virus dengue	6
Gambar 2.1.1(2).	Genom dan proses translasi poliprotein virus dengue.....	7
Gambar 2.1.3.	Dendogram protein <i>envelope</i> empat serotipe virus dengue	10
Gambar 2.1.4.	Siklus hidup virus dengue	11
Gambar 2.4.2.	Prinsip uji <i>sandwich</i> ELISA	17
Gambar 2.7.	Kurva pertumbuhan kinetik virus.....	23
Gambar 2.8.	Siklus lisis pada infeksi virus	24
Gambar 3.4.	Skema cara kerja dalam penelitian	39
Gambar 4.1.1.	Hasil pengamatan tujuh galur sel setelah inkubasi 48 jam	41
Gambar 4.1.3.	Hasil <i>plaque assay</i> D1-Westpac, D2-TSV10, D3-H87 dan D4-H241	46
Gambar 4.2.2(1).	Grafik pertumbuhan virus D1-Westpac (A) dan D2-TSV01 pada enam galur sel (B).....	51
Gambar 4.2.2(2).	Grafik pertumbuhan virus D3-H87 (A) dan D4-H241 pada enam galur sel (B).....	52
Gambar 4.3(1).	Grafik ekspresi protein NS1 empat serotipe virus dengue pada sel Vero76	57
Gambar 4.3(2).	Grafik ekspresi protein NS1 empat serotipe virus dengue pada sel A549	58
Gambar 4.4(1).	Hasil amplifikasi RNA virus dengue hasil uji kinetik pada sel Vero76	60
Gambar 4.4(2).	Hasil amplifikasi RNA virus dengue hasil uji kinetik pada sel A549	61
Gambar 4.5.	Hasil amplifikasi RNA virus dengue hasil uji kinetik pada supernatan virus yang tidak menunjukkan pertumbuhan.....	63

DAFTAR TABEL

Tabel 2.1.3(1).	Perbandingan homologi (%) sekuen protein <i>envelope</i> empat serotipe virus dengue	9
Tabel 2.4.1.	Sekuen primer untuk deteksi virus dengue	15
Tabel 2.5.	Beberapa galur sel yang umum digunakan	19
Tabel 4.2.2.	Hasil uji statistik non-parametrik Kruskal-Wallis pertumbuhan empat serotipe virus dengue	53
Tabel 4.3.	Dilusi supernatan untuk uji ELISA	56
Tabel 4.5.	Hasil uji kinetik konfirmasi pada sel HepG2 dan MDCK	64

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1	Komponen kit yang digunakan dalam penelitian	76
Lampiran 2	Sekuen primer yang digunakan dalam penelitian	76
Lampiran 3	Komponen <i>master mix</i> I dan II reaksi <i>reverse transcriptase</i>	77
Lampiran 4	Komponen <i>master mix</i> PCR untuk deteksi virus dengue ..	77
Lampiran 5	Perhitungan <i>plaque assay</i> virus stok	78
Lampiran 6	Perhitungan volume inokulum sel pada uji kinetik	80
Lampiran 7	Perhitungan volume inokulum virus dengue pada uji kinetik	85
Lampiran 8	Tabel data hasil uji <i>sandwich</i> ELISA protein NS1 pada sel Vero76	93
Lampiran 9	Tabel data hasil uji <i>sandwich</i> ELISA protein NS1 pada sel A549	93
Lampiran 10	Hasil uji normalitas Shapiro-Wilk menggunakan SPSS v.17	94
Lampiran 11	Hasil uji non-parametrik Kruskal-Wallis menggunakan SPSS v.17	96
Lampiran 12	Peta perlakuan dalam eksperimen	98
Lampiran 13	Data tabel hasil uji kinetik D1-Westpac	99
Lampiran 14	Data tabel hasil uji kinetik D2-TSV01	102
Lampiran 15	Data tabel hasil uji kinetik D3-H87	105
Lampiran 16	Data tabel hasil uji kinetik D4-H241	108

BAB 1 PENDAHULUAN

Demam berdarah dengue merupakan penyakit yang penyebarannya paling cepat diantara penyakit dengan vektor nyamuk lainnya. Lebih dari 50 juta orang di dunia diperkirakan terinfeksi dan sekitar 2,5 milyar orang beresiko terinfeksi virus dengue. Lebih dari 70% atau sekitar 1,8 milyar kasus dengue terjadi di Asia Tenggara (WHO 1997: 3 & 4). Saat ini infeksi virus dengue sudah menyebar ke lebih dari 29 provinsi di Indonesia dan meningkat secara signifikan hingga mencapai 80.065 kasus pada tahun 2010 (Setiati *dkk.* 2006: 2 & 6; WHO-SEARO 2010: 3). Namun hingga saat ini, baik vaksin maupun obat antiviral untuk menangani infeksi virus dengue belum ditemukan (Qi *dkk.* 2008: 91).

Demam berdarah dengue disebabkan oleh infeksi virus dengue yang ditandai demam hingga 38--41°C dengan gejala-gejala lain yang tidak spesifik. Manifestasi yang lebih parah, yaitu demam berdarah dengue (DBD) dan sindrom renjatan dengue (SRD), ditandai dengan kebocoran kapiler dan trombositopenia (Leitmeyer *dkk.* 1999: 545; Gubler 1998: 485). Virus dengue (DENV) merupakan kelompok arbovirus (*arthropod-borne virus*) dari Famili *Flaviviridae* Genus *Flavivirus*. Genom virus dengue berupa RNA untai tunggal positif (+ssRNA) dengan panjang genom sekitar 10,7 kilobasa (kb). Berdasarkan antigenisitas, virus dengue dibedakan menjadi empat serotipe, yaitu DENV-1, DENV-2, DENV-3, dan DENV-4 (Henchal & Putnak 1990: 378; Mukhopadhyay *dkk.* 2005: 13).

Virus dengue ditransmisikan ke manusia melalui gigitan nyamuk *Aedes* spp. betina, khususnya *Aedes aegypti* sebagai vektor utama (Gubler 1998: 484). Setelah memasuki tubuh manusia, virus dengue menyebar ke beberapa jaringan. Wu *dkk.* (2000 *lihat* Marovich *dkk.* 2001: 220) berhasil mendeteksi penyebaran virus dengue pada sel dendritik, khususnya sel Langerhans pada kulit. Selain itu menurut Boonpucknavig *dkk.* (1979 *lihat* Bhamarapravati 1997: 125) virus dengue juga terdeteksi pada makrofag, limfosit B, limfosit T, trombosit, *Bilroth cords* pada limpa, korteks pada timus, sel Kupffer pada hati, makrofag alveolar, dan monoselular fagosit pada kulit. Penyebaran virus dengue pada sel atau

jaringan tersebut didukung oleh penemuan Jessie *dkk.* (2004: 1416--1417) melalui pendekatan *immunohisto-chemistry* (IHC) yang berhasil mendeteksi antigen virus dengue pada hati, limpa, alveolar, ginjal, dan darah.

Mekanisme pasti dari patogenesis infeksi dengue masih sedikit diketahui karena belum adanya hewan model uji yang sesuai. Namun, faktor respon imun inang dan karakteristik virus dicurigai berkaitan dengan patogenesis infeksi dengue (Gubler 1998: 487). Hasil penelitian Tang *dkk.* (2010: 7) menunjukkan bahwa derajat keparahan penyakit dengue meningkat seiring peningkatan jumlah virus dalam darah (viremia) dan sitokin interferon alfa ($IFN\alpha$). Viremia diketahui berkaitan dengan virulensi virus karena dipengaruhi oleh kecepatan replikasi virus dan kemampuan virus menginfeksi sel yang berbeda (Gubler 1998: 488).

Virulensi virus dapat diketahui dari kecepatan replikasi, efek infeksi virus terhadap sel (sitopatologi), dan jumlah genom virus (Rico-Hesse 2009: 2). Hal tersebut didukung oleh Vaughn *dkk.* (2000: 8) yang membuktikan bahwa kecepatan replikasi virus dengue yang tinggi dalam tubuh pasien berkorelasi positif dengan peningkatan keparahan penyakit dengue. Kecepatan replikasi virus dengue secara *in vitro* dapat diketahui menggunakan uji pertumbuhan kinetik virus.

Efisiensi replikasi virus diketahui berbanding lurus dengan keberadaan protein non struktural 1 (NS1) ekstraseluler virus dengue yang dilepaskan dalam bentuk heksamer (Flamand *dkk.* 1999: 6106). Keberadaan protein NS1 dapat dideteksi menggunakan metode *sandwich enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) (Alcon *dkk.* 2002: 380). Sementara itu, deteksi genom virus dapat dilakukan secara semi kuantitatif menggunakan teknik *polymerase chain reaction* (PCR) dan dilanjutkan visualisasi dengan elektroforesis gel agarosa (Lanciotti *dkk.* 1992: 550). Metode tersebut memiliki sensitivitas tertinggi dalam mendeteksi virus dengue dan spesifisitas dalam menentukan serotipe virus dengue (Gubler 1998: 491).

Secara *in vitro*, virus dengue mampu bereplikasi pada beberapa galur sel baik vertebrata maupun invertebrata. Replikasi virus dengue sangat bergantung pada jenis sel inang dan juga tahap diferensiasi sel. Isolasi dan propagasi virus dengue dapat dilakukan baik pada sel nyamuk maupun sel mamalia. Namun, sel

mamalia memiliki sensitivitas yang lebih rendah dibandingkan dengan sel nyamuk dalam isolasi virus dengue (Shu & Huang 2004: 643). Galur sel nyamuk, C6/36, diketahui merupakan galur sel yang paling sensitif untuk isolasi virus dengue (Igarashi 1978: 534). Sementara itu, beberapa jenis galur sel mamalia yang dapat mendukung pertumbuhan virus dengue diantaranya sel monosit, fibroblas, sumsum tulang belakang, epitelial, dan endotelial (Rothman 1997: 251--252). Namun, belum diketahui galur sel mamalia terbaik untuk mendukung pertumbuhan virus dengue dan menghasilkan progeni virus yang tinggi.

Sedikitnya informasi mengenai karakter pertumbuhan virus dengue pada galur sel model mamalia merupakan salah satu faktor pembatas dilakukannya analisis patogenesis terhadap virus dengue secara *in vitro*. Oleh karena itu, penelitian ini dilakukan untuk mengetahui galur sel mamalia alternatif terbaik bagi pertumbuhan virus dengue dengan melihat karakter pertumbuhan virus dengue. Parameter pertumbuhan virus dengue pada tiap sel diketahui dengan membandingkan kecepatan replikasi, deteksi genom, dan ekspresi protein NS1 virus dengue pada galur sel. Kecepatan replikasi diperoleh melalui uji kinetik pertumbuhan, deteksi genom secara semi-kuantitatif dianalisis menggunakan PCR, dan ekspresi protein NS1 diuji dengan ELISA.

Penelitian dilakukan untuk mengetahui karakter pertumbuhan virus dengue pada beberapa galur sel. Sel yang digunakan yaitu C6/36 dari nyamuk *Aedes albopictus* (Igarashi 1978: 534--535; Vasilakis *dkk.* 2009: 14), Vero76 dari ginjal monyet hijau Afrika (*Cercopithecus aethiops*) (Marianneau *dkk.* 1996: 2548; Vasilakis *dkk.* 2009: 14; Ludert *dkk.* 2008: 6), MDCK dari ginjal anjing *cocker spaniel* (*Canis familiaris*), 293 (atau dikenal juga sebagai HEK-293) dari ginjal embrionik manusia (Diamond *dkk.* 2000: 7815), HepG2 dari kanker hati manusia (Marianneau *dkk.* 1996: 2548; Diamond *dkk.* 2000: 7815; Fink *dkk.* 2007: 2), dan A549 dari sel kanker paru-paru manusia (Diamond *dkk.* 2000: 7815; Fink *dkk.* 2007: 2).

Tujuan dari penelitian yaitu untuk mengetahui karakter pertumbuhan virus dengue pada enam galur sel dan menentukan galur sel mamalia alternatif terbaik untuk pertumbuhan virus dengue. Hasil penelitian diharapkan dapat memberi informasi mengenai karakter pertumbuhan virus dengue dan galur sel alternatif

mamalia terbaik untuk mengukur pertumbuhan virus *in vitro*. Hasil penelitian juga dapat digunakan sebagai informasi tambahan dalam eksperimen *in vitro* tentang virus dengue, sebagai pendukung pengembangan obat, atau vaksin dengue.



BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Virus Dengue

2.1.1. Klasifikasi, Struktur dan Genom Virus Dengue

Dengue merupakan penyakit yang disebabkan oleh infeksi virus dengue (Mukhopadhyay *dkk.* 2005: 13). Infeksi oleh virus dengue dapat menyebabkan manifestasi klinis yang berjenjang, yaitu demam dengue (DD), demam berdarah dengue (DBD), dan sindrom renjatan dengue (SRD). Demam dengue ditandai oleh kenaikan suhu tubuh 38--41 °C yang diikuti gejala lain yang tidak spesifik. Manifestasi yang lebih berat, yaitu DBD dan SRD, ditandai dengan kebocoran kapiler dan trombositopenia (Leitmeyer *dkk.* 1999: 545; Gubler 1998: 485).

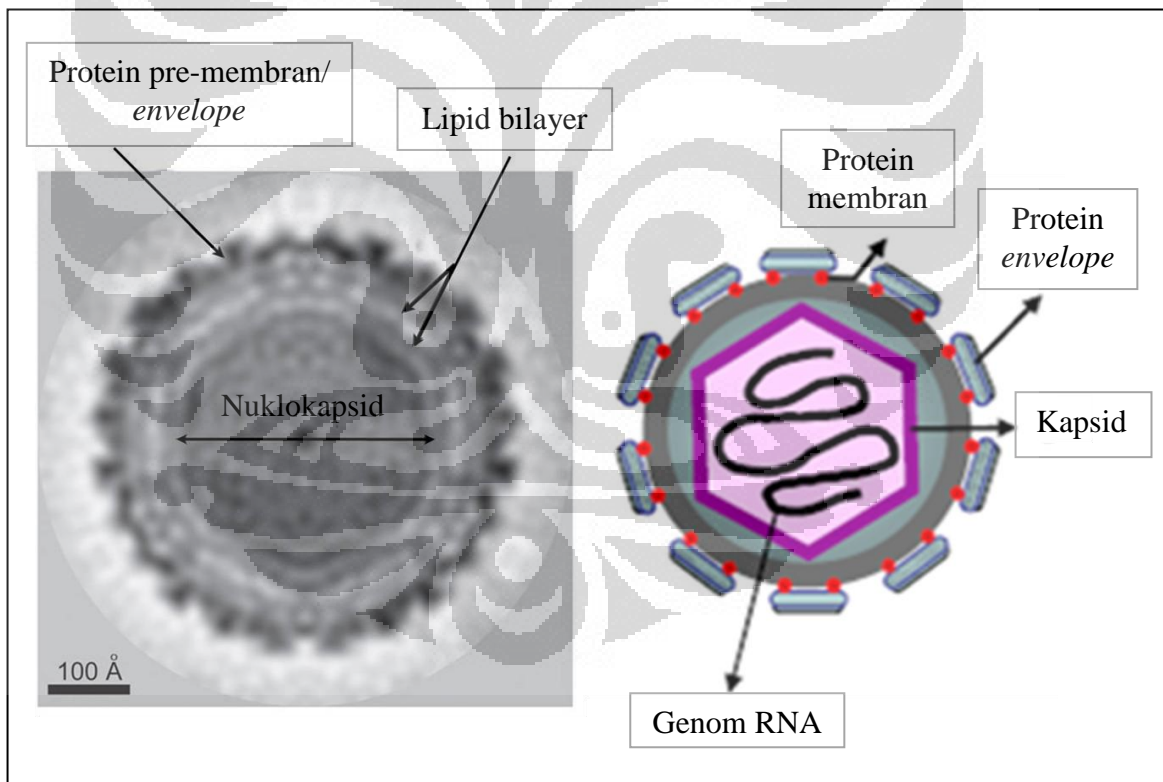
Virus dengue (DENV) ditularkan ke manusia melalui gigitan nyamuk *Aedes (Stegomyia) spp.* Vektor utama adalah nyamuk dari spesies *A. aegypti* walaupun transmisi oleh nyamuk *A. albopictus* juga telah dilaporkan (Gubler 1998: 484). Virus dengue termasuk dalam Famili Flaviviridae dan Genus *Flavivirus*. *Flavivirus* berasal dari bahasa Latin “*flavus*” yang berarti kuning karena infeksi dengan salah satu anggota genus ini, yakni *yellow fever virus* (YFV), mengakibatkan penyakit kuning (Mukhopadhyay *dkk.* 2005: 13).

Anggota *Flavivirus* yang terkenal sebagai patogen pada manusia yaitu *yellow fever virus* (YFV), *Japanese encephalitis virus* (JEV), *St. Louis encephalitis virus* (SLEV), dan *West Nile virus* (WNV) (Kuno *dkk.* 1998: 73). Namun, dengue virus memiliki tingkat penyebab penyakit dan kematian tertinggi dalam Genus *Flavivirus*. Dengue virus menginfeksi 50--100 juta manusia tiap tahunnya, 500.000 pasien diantaranya mengalami gejala yang disebut dengan *dengue hemorrhagic fever* (DHF) atau demam berdarah dengue (DBD) yang menyebabkan 20.000 kematian, terutama pada anak kecil (Qi *dkk.* 2008: 91).

Pada tahun 1944, Albert Sabin berhasil mengisolasi dan mengidentifikasi virus dengue. Virus dengue kemudian dibedakan menjadi empat serotipe

berdasarkan antigenisitasnya yaitu DEN-1, DEN-2, DEN-3, dan DEN-4. Individu yang terinfeksi salah satu serotipe virus dengue akan membentuk kekebalan seumur hidup pada serotipe tersebut, tetapi tidak ada mekanisme perlindungan silang terhadap infeksi serotipe virus dengue lainnya. Dengan demikian, individu yang hidup pada daerah endemik dapat terinfeksi dengue sebanyak hingga empat kali sepanjang hidupnya (Gubler 1998: 484; Chakraborty 2008: 18).

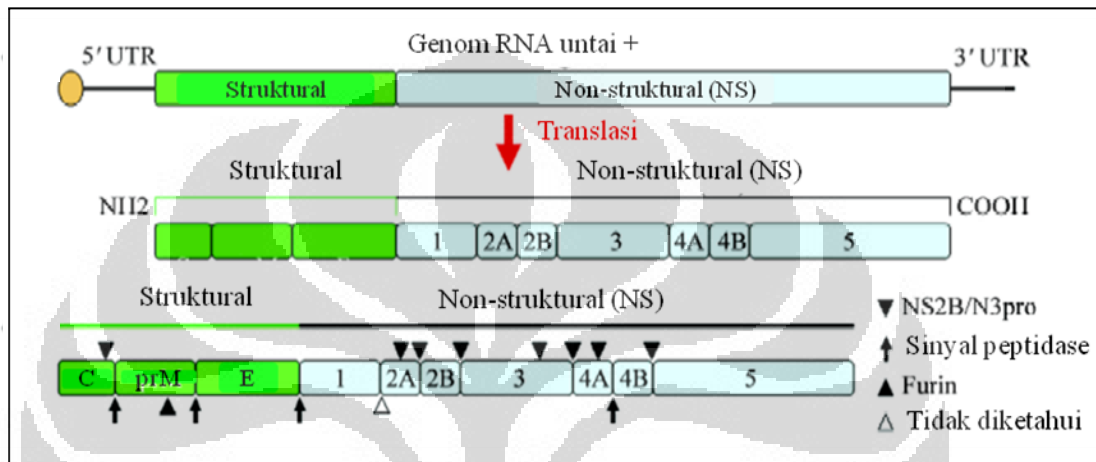
Morfologi dari Genus *Flavivirus* tersusun atas *envelope* lipid berbentuk bulat dengan tebal sekitar 10 nm, dan nukleokapsid ikosahedral berdiameter sekitar 30 nm yang terdiri atas kapsid dan RNA genom (Gambar 2.1.1(1)). Virion lengkap memiliki diameter sekitar 40--50 nm. Materi genetiknya berupa *positive single stranded RNA (+ssRNA)* atau RNA untai tunggal dengan panjang genom sekitar 10.8 kb (Henchal & Putnak 1990: 378; Mukhopadhyay *dkk.* 2005: 13).



Gambar 2.1.1(1). Struktur virus dengue
[Sumber: Kuhn *dkk.* 2002: 718, telah dimodifikasi.]

Genom *Flavivirus* terdiri atas satu *open reading frame* (ORF) yang mengkode poliprotein tunggal yang diapit oleh 5' dan 3' *non-coding region*

(NCR). Urutan gene penyandi poliprotein tersebut adalah 5'-C-prM-E-NS1-NS2A-NS2B-NS3-NS4A-NS4B-NS5-3' (Gambar 3.1.1(2)). Poliprotein tunggal tersebut terdiri atas tiga protein struktural dan tujuh protein non-struktural. Tiga protein struktural tersebut yaitu C (capsid), prM/M (membran), dan protein E (*envelope*). Sementara itu, tujuh protein non-struktural terdiri atas NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, dan NS5 (Chang 1997: 176; Novoa *dkk.* 2005: 161).



Gambar 2.1.1(2). Genom dan proses translasi poliprotein virus dengue [Sumber: Qi *dkk.* 2008: 92, diterjemahkan sesuai aslinya.]

Protein C merupakan protein kecil dengan berat molekul 9--12 kDa yang tersusun dari 112 sampai 127 asam amino. Protein C merupakan protein virus pertama yang disintesis selama translasi dan memiliki muatan positif kuat karena mengandung banyak residu asam amino *lys* dan *arg*. Sifat protein C tersebut dipercaya berperan untuk menetralkan muatan negatif pada molekul RNA virus. Protein prM merupakan suatu glikoprotein dengan berat molekul 18,1--19,1 kDa dan merupakan prekursor untuk protein M. Protein M memiliki berat molekul 7--9 kDa yang tersusun atas 75 asam amino dan diduga berperan untuk mengontrol aktivitas fusi (Henchal & Putnak 1990: 379; Chang 1997: 185--186).

Protein E yang berupa glikoprotein, merupakan komponen protein utama pada permukaan virus dan merupakan antigen determinan utama pada partikel virus. Berat molekul Protein E yaitu 55--60 kDa yang tersusun atas 494--501 asam amino. Protein E mempunyai epitop penting yang berhubungan dalam beberapa aktivitas biologis, antara lain ikatan dengan reseptor, induksi antibodi

spesifik untuk proses netralisasi sebagai perlindungan respon imun, hemaglutinasi eritrosit, mediasi fusi antara virus dan membran yang spesifik pada pH asam, dan perakitan virus (Chang 1997: 185--187; Lindenbach *dkk.* 2007: 1104--1105).

2.1.2. Protein NS1 Virus Dengue

Seluruh protein non struktural virus dengue merupakan protein intraseluler kecuali protein NS1. Protein NS1 berupa glikoprotein yang tersusun atas 353--354 asam amino dan memiliki berat molekul 42--50 kDa. Protein tersebut diekspresikan pada sel mamalia terinfeksi dan mempunyai dua bentuk yang berbeda saat berada pada permukaan sel berasosiasi dengan membran dan saat disekresikan pada medium ekstraseluler (Chang 1997: 187--188; Das *dkk.* 2009: 1).

Protein NS1 yang disekresikan bersirkulasi dan terakumulasi pada serum pasien penderita dengue. Antigen NS1 diekspresikan oleh keempat serotipe virus dengue dan dapat dideteksi sampai 9 hari pertama demam (Alcon *dkk.* 2002: 378). Berdasarkan penelitian yang dilakukan Flaman *dkk.* (1999: 6104 & 6106), diketahui protein NS1 memiliki struktur heksamer. Protein NS1 diketahui berperan penting dalam viabilitas virus dan berfungsi sebagai kofaktor untuk tahap awal replikasi virus dan berkorelasi dengan efisiensi replikasi.

Berdasarkan Avirutnan *dkk.* (2007: 1799 & 1804), diketahui NS1 terlarut dalam plasma yang disekresikan oleh sel yang terinfeksi akan berikatan kuat pada sel endotelial dan fibroblast yang tak terinfeksi. Antigen NS1 yang berikatan pada sel endotelial yang tidak terinfeksi tersebut menginduksi terbentuknya kompleks imun dan dihipotesiskan berperan dalam mekanisme kebocoran plasma yang terjadi selama infeksi virus dengue yang berat. Hingga saat ini, mekanisme pengikatan NS1 dengan membran plasma masih menjadi perdebatan.

2.1.3. Hubungan Evolusi Empat Serotipe Virus Dengue

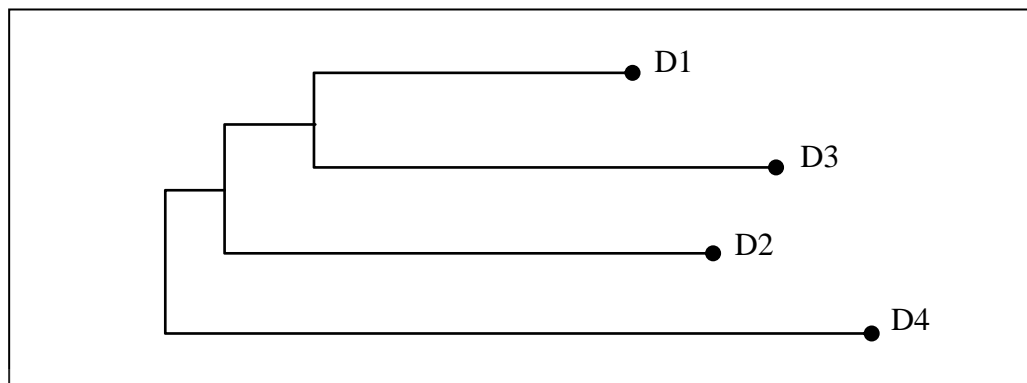
Virus dengue dibedakan menjadi empat serotipe berdasarkan perbandingan sekuen asam amino pada glikoprotein E. Perbandingan sekuen asam amino memperlihatkan variasi minor pada panjang glikoprotein tersebut. DEN-1, DEN-2, dan DEN-4 terdiri atas 495 asam amino, sedangkan DEN-3 terdiri atas 493 asam amino. Namun, posisi residu sistein (*Cys*) bersifat *conserved* pada keempat serotipe. Oleh karena itu, glikoprotein E pada empat serotipe memiliki struktur sekunder dan tersier yang mirip (Westaway & Blok 1997: 160).

Tabel 2.1.3. Perbandingan homologi (%) sekuen protein *envelope* pada empat serotipe virus dengue

	Virus dengue (D)			
	D1	D2	D3	D4
D1-Nauru	-	157	112	187
D2-Jamaica	68,3 %	-	162	184
D3-H87	77,4 %	67,3 %	-	181
D4-Dominica	62,2 %	62,8 %	63,4 %	-

[Sumber: Westaway & Blok 1997: 161, diterjemahkan sesuai aslinya.]

Lanciotti *dkk.* (1994) telah membandingkan sekuen protein E pada empat serotipe virus dengue (*lihat* Westaway & Blok 1997: 161). Hasilnya diketahui bahwa DEN-1 dan DEN-3 memiliki hubungan evolusi yang lebih dekat dibandingkan dengan serotipe lainnya (Tabel 2.1.3). Sementara itu, Zanotto *dkk.* (1996) menganalisis sekuen genom pada gen E dan E/NS1 *junction* dan menunjukkan DEN4-memiliki hubungan evolusi paling jauh, diikuti DEN-2, DEN-1 dan DEN-3 (*lihat* Westaway & Blok 1997: 161). Hubungan evolusi tersebut kemudian dideskripsikan menjadi sebuah pohon filogeni menggunakan metode *neighbor-joining* (Gambar 2.1.3).

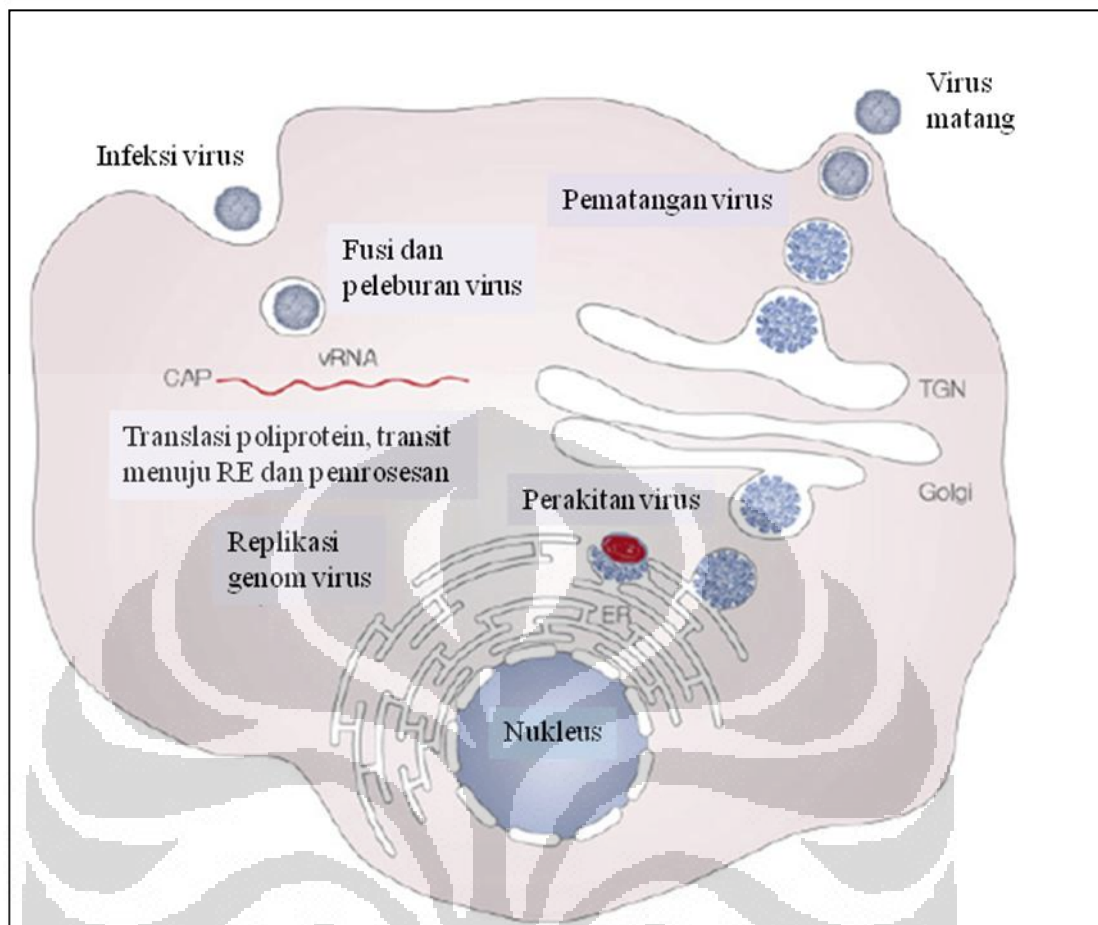


Gambar 2.1.3. Dendrogram protein *envelope* dari empat serotipe virus dengue [Sumber: Westaway & Blok 1997: 161.]

2.1.4. Siklus Hidup Virus Dengue

Virus dengue memasuki sel inang dengan cara berikatan pada reseptor spesifik permukaan sel inang (Gambar 2.1.4). Virus kemudian masuk ke dalam sel inang melalui proses endositosis yang dimediasi reseptor. Kondisi lingkungan yang asam pada endosom memicu dimerisasi yang bersifat irreversibel pada protein E, sehingga menghasilkan fusi antara envelope virus dan membran sel. Nukleokapsid kemudian dilepaskan ke sitoplasma dan terjadi disosiasi antara protein C dan RNA genom, serta replikasi RNA genom (Mukhopadhyay *dkk.* 2005: 14).

Pada saat genom dilepaskan ke sitoplasma, +ssRNA virus ditranslasi menjadi poliprotein tunggal oleh protease virus dan inang. Replikasi genom terjadi di membran intraselular, sedangkan perakitan partikel virus terjadi di permukaan retikulum endoplasma (RE). Partikel virus yang belum matang dibentuk di dalam lumen retikulum endoplasma. Partikel yang tersusun atas protein E dan prM, membran lipid, dan nukleokapsid tersebut tidak dapat menginduksi fusi dengan sel inang, sehingga bersifat non-infeksius karena protein prM memerlukan proses lebih lanjut. Partikel kemudian diteruskan ke trans Golgi dan terjadi pemecahan prM yang menyebabkan partikel menjadi matang dan bersifat infeksius (Qi *dkk.* 2008: 93).



Gambar 2.1.4. Siklus hidup virus dengue
[Sumber: Mukhopadhyay *dkk.* 2005: 14, diterjemahkan sesuai aslinya.]

Partikel subviral juga dibentuk di RE tetapi hanya mengandung glikoprotein dan membran, tidak memiliki protein C dan RNA genom, sehingga partikel tersebut bersifat non infeksius. Virus yang sudah matang dan partikel subviral dilepaskan dari sel inang melalui proses eksositosis (Mukhopadhyay *dkk.* 2005: 14).

2.2 Patogenesis dan Virulensi Virus Dengue

Virus dengue dapat menyebabkan penyakit melalui dua mekanisme. Mekanisme pertama yaitu virus menginfeksi kemudian membunuh sel pada organ target. Infeksi virus dengue menyebabkan efek sitopatik yang mengakibatkan malfungsi organ. Mekanisme kedua yaitu virus tidak menyebabkan efek sitopatik

yang parah tetapi respon imun inang terhadap virus menyebabkan malfungsi organ. Secara normal, respon imun bertujuan sebagai mekanisme proteksi inang terhadap keberadaan virus. Namun, respon imun pada kondisi dan tingkat tertentu dapat menyebabkan penyakit. Hal tersebut bergantung pada jenis organ yang terkena dampak respon imun dan tingkat respon imun. Peristiwa saat respon imun dapat menyebabkan penyakit disebut dengan imunopatogenesis (Kurane & Ennis 1997: 273).

Mekanisme patogenesis infeksi dengue masih sedikit diketahui karena belum tersedianya model hewan uji yang sesuai. Ada beberapa faktor yang memengaruhi patogenesis infeksi dengue, diantaranya yaitu respon imun inang dan karakteristik virus (Gubler 1998: 487). Sitokin dan senyawa mediator dihipotesiskan menyebabkan peningkatan permeabilitas vaskuler. Senyawa yang terlibat diantaranya *tumor necrosis factor* (TNF), interleukin-1 (IL-1), IL-2, IL-6, *platelet activating factor* (PAF), dan histamin. Sitokin dan senyawa mediator diproduksi dengan induksi dari sitokin lainnya. Oleh karena itu, saat satu sitokin terbentuk maka sitokin tersebut akan memengaruhi pembentukan sitokin lainnya yang mengakibatkan peningkatan kadar sitokin dan senyawa mediator, sehingga memberikan efek sinergis pada permeabilitas vaskuler (Kurane & Enis 1997: 278-279).

Viremia atau jumlah virus dalam darah berhubungan dengan derajat keparahan infeksi dengue. Hal tersebut didukung oleh penelitian Tang *dkk.* (2010: 7) yang memperlihatkan adanya korelasi positif antara viremia dan sitokin interleukin alfa dengan derajat keparahan penyakit. Viremia berhubungan dengan virulensi dari strain virus dengue yang menginfeksi. Virulensi virus didefinisikan sebagai kemampuan suatu virus untuk menyebabkan penyakit pada inang (Rohtman 1997: 255) dan dapat diketahui dari beberapa karakteristik, diantaranya kecepatan replikasi, jumlah genom, efek infeksi virus terhadap sel (sitopatologi), serta kemampuan virus untuk menginfeksi beberapa sel berbeda (Gubler 1998: 488; Rico-Hesse 2009: 2). Vaughn *dkk.* (2000: 8) membuktikan bahwa kecepatan replikasi virus dengue yang tinggi dalam tubuh pasien berkorelasi positif dengan peningkatan keparahan penyakit dengue.

2.3. Lokalisasi Virus Dengue pada Jaringan atau Sel

Keberadaan virus dengue dapat diketahui dengan mendeteksi antigen virus dan genom virus pada jaringan autopsi atau biopsi dengan metode *immunohistochemistry* (IHC) seperti imunofluoresens dan imunoperoksidase. Keberadaan genom virus dideteksi dengan hibridisasi *in situ* dan amplifikasi cDNA (Bhamarapravati 1997: 125).

Wu *dkk.* (2000) menyatakan bahwa target awal replikasi virus dengue adalah sel dendritik atau Langerhans pada kulit (*lihat* Marovich *dkk.* 2001: 220). Hal tersebut disebabkan kulit merupakan barrier pertama terhadap infeksi virus dengue yang ditransmisikan melalui gigitan nyamuk. Target virus dengue lainnya adalah sel monosit atau makrofag. Namun, Marovich *dkk.* (2001: 223) membuktikan bahwa virus dengue lebih cepat menginfeksi sel dendritik dibandingkan monosit atau makrofag.

Virus kemudian menyebar ke berbagai jaringan seperti hati, limpa, alveolar, ginjal dan darah (Jessie *dkk.* 2004: 1416--1417). Boonpucknavig *dkk.* (1979 *lihat* Bhamarapravati 1997: 125)) secara lebih rinci mendeteksi keberadaan virus dengue pada *Bilroth cords* limpa, bagian korteks dari timus, sel Kupffer di hati, makrofag alveolar, monoselular fagosit kulit, limfosit T, limfosit B, dan trombosit.

2.4. Metode Deteksi Virus Dengue

Deteksi virus dengue dapat dilakukan dengan cara mendeteksi virus spesifik, antigen virus, sekuen genom, dan antibodi. Beberapa metode dasar yang digunakan untuk mendeteksi virus dengue, yaitu isolasi dan karakterisasi virus, deteksi antibodi spesifik virus dengue (deteksi serologis), dan deteksi sekuen genom melalui teknologi amplifikasi asam nukleat (deteksi molekuler) (Shu & Huang 2004: 642).

2.4.1. Deteksi Molekuler

Beberapa metode yang digunakan untuk diagnosis infeksi virus dengue antara lain *hybridization probe* dan *reverse transcriptase polymerase chain reaction* (RT-PCR). Metode *hybridization probe* dilakukan dengan mendeteksi asam nukleat virus dengan *cloned hybridization probe*. Metode RT-PCR merupakan metode yang lebih sering digunakan karena memiliki sensitifitas yang lebih tinggi untuk mendeteksi infeksi virus dengue daripada metode lainnya (Gubler 1998: 490--491).

Metode RT-PCR memiliki sensitifitas dalam mendeteksi virus dengue dan spesifisitas dalam menentukan serotipe virus dengue. Sensitifitas pada RT PCR hampir sama dengan isolasi virus dengan galur sel C6/36 walaupun metode isolasi tetap merupakan *gold standard* deteksi virus dengue. Keunggulan RT PCR dibandingkan dengan metode lainnya, diantaranya penanganan yang lebih mudah, cepat, produk PCR tidak terpengaruh oleh keberadaan antibodi, lebih sederhana, dan bersifat reproduibel (Gubler 1998: 491).

Metode RT-PCR untuk deteksi infeksi virus dengue telah dikembangkan oleh Lanciotti *dkk.* (1992: 545). Genom RNA virus dikonversi menjadi cDNA dengan menggunakan enzim *reverse transcriptase* dan primer *reverse D2*, kemudian diamplifikasi dengan primer *forward D1* dan primer *reverse D2* (Tabel 2.4.1). Kedua primer tersebut bersifat homolog pada RNA genom keempat serotipe virus dengue (Lanciotti *dkk.* 1992: 546).

Deteksi molekuler dengue yang lebih akurat dan sensitif dilakukan menggunakan *real-time* RT-PCR yang salah satunya dikembangkan oleh Lai *dkk.* (2007: 937). Metode *real-time* RT-PCR menggunakan SBYR *green* dapat menguantifikasi jumlah RNA genom virus dengue pada titer minimum 0,01 pfu. Primer yang digunakan adalah pan-dengue *forward* dan *reverse* dengan sekuen target pada 3' *non-coding region* (NCR) virus dengue (Tabel 2.4.1). Hasil uji spesifitas primer menunjukkan tidak terjadi reaksi silang pasangan primer dengan kelompok *Flavivirus* lainnya. Sementara itu, hasil validasi menunjukkan metode tersebut memiliki sensitivitas yang lebih tinggi dalam mendeteksi virus dengue dibandingkan isolasi virus dan IFA (Lai *dkk.* 2007: 937 & 939).

Tabel 2.4.1. Sekuen primer untuk deteksi virus dengue

Primer	Sekuen
D1	5'-TCAATATGCTGAAACGCGCGAGAAACCG-3'
D2	5'-TTGCACCAACAGTCAATGTCTTCAGGTTC-3'
Pan-dengue <i>forward</i>	5'-TTGAGTAAACYRTGCTGCCTGTAGCTC-3'
Pan-dengue <i>reverse</i>	5'-GAGACAGCAGGATCTCTGGTCTYTC-3'

[Sumber: Lanciotti *dkk* 1992: 546; Lai *dkk.* 2007: 936, telah diolah kembali.]

2.4.2. Deteksi Serologis

Diagnosis serologis dilakukan dengan cara deteksi antigen atau deteksi antibodi. Deteksi antigen virus dengue umumnya dilakukan dengan metode ELISA dan uji *dot blot*. Kedua metode tersebut mendeteksi antigen E/M dan antigen NS1. Konsentrasi antigen E/M dan NS1 yang tinggi dapat membentuk kompleks imun yang dapat dideteksi dalam serum pasien pada fase akut, baik pada infeksi primer maupun sekunder, hingga 9 hari setelah gejala awal (Shu & Huang 2004: 644).

Diagnosis secara serologis infeksi virus dengue lebih sulit dilakukan karena sering terjadi reaksi silang dengan antigen dari kelompok Flavivirus lainnya (Shu & Huang 2004: 644). Selain itu, keberhasilan dari diagnosis serologis sangat tergantung dari titer antibodi spesifik virus dengue. Infeksi virus dengue akan terdeteksi pada titer antibodi spesifik yang tinggi, yaitu pada fase akut hingga fase pemulihan (Gubler 1998: 488).

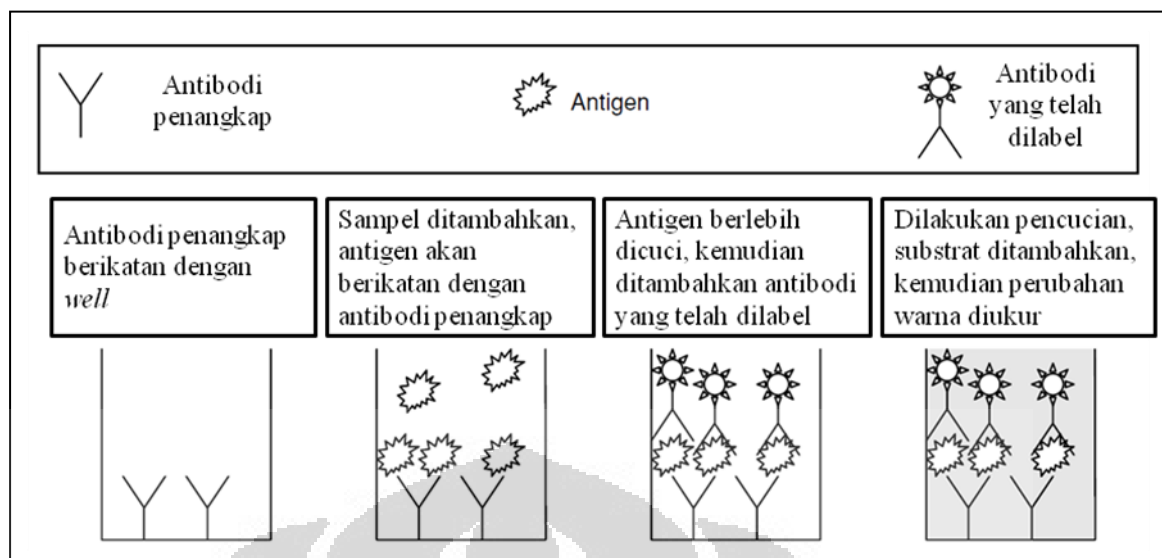
Uji serologis dasar yang rutin dilakukan untuk mendiagnosis infeksi dengue, yaitu *hemagglutination-inhibition* (HI), *complement fixation* (CF), *neutralizing test* (NT), dan *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) (Gubler 1998: 488). ELISA merupakan metode yang umum digunakan dalam studi surveilans epidemiologi karena mampu diaplikasikan pada jumlah sampel banyak dengan volume sampel yang sedikit, seperti pada kasus dengue (Wang 2006: 53). Uji ELISA relatif lebih sederhana dan ekonomis. Namun, uji tersebut tidak mampu memperbanyak antigen organisme infeksius seperti pada teknik kultur, atau asam nukleat seperti pada PCR. Oleh karena itu, diagnosis dengan uji

ELISA memiliki sensitifitas lebih rendah dibandingkan teknik lainnya (Campbell & Landry 2006: 23).

Uji ELISA merupakan teknik pengujian serologi yang didasarkan pada interaksi atau ikatan spesifik antara antigen dan antibodi. Interaksi antibodi dan antigen tersebut ditandai menggunakan suatu enzim yang terikat pada antibodi atau antigen spesifik. Uji ELISA memiliki beberapa jenis diantaranya *direct ELISA*, *indirect ELISA*, *sandwich ELISA*, dan *competitive ELISA*. Namun, *sandwich ELISA* memiliki sensitivitas tertinggi diantara jenis ELISA lainnya tetapi membutuhkan waktu dan biaya yang lebih banyak (Campbell & Landry 2006: 26; Wang 2006: 53).

Pada *sandwich ELISA* antibodi yang digunakan ada dua macam, yaitu antibodi primer sebagai antibodi penangkap dan antibodi sekunder sebagai antibodi pendeteksi. *Sandwich ELISA* lebih banyak dimanfaatkan untuk mendeteksi keberadaan antigen multivalen yang kadarnya sangat rendah pada suatu larutan dengan. *Sandwich ELISA* memiliki tingkat sensitivitas tinggi terhadap antigen yang diinginkan sebagai hasil interaksi antigen tersebut dan kedua antibodi (Murphy *dkk.* 2008: 203).

Pada *sandwich ELISA* *microtiter plate* diisi dengan antibodi penangkap sehingga antibodi tersebut menempel pada dinding mikrotiter yang telah dilapisi oleh polistiren atau polivinil. Antigen kemudian ditambahkan sehingga akan membentuk kompleks antibodi-antigen, lalu ditambahkan antibodi sekunder yang telah dilabel dengan enzim (Gambar 2.4.2). Substrat organik kemudian ditambahkan sehingga akan terlihat perubahan warna substrat pada sampel yang positif mengandung antigen, tetapi tidak pada sampel negatif. Intensitas perubahan warna tersebut mengindikasikan banyaknya antigen yang terdapat pada sampel dan dikuantifikasi menggunakan spektrofotometer atau *plate reader* (Murphy *dkk.* 2008: 203; Kudesia & Wreghitt 2009: 207).



Gambar 2.4.2. Prinsip uji *sandwich* ELISA

[Sumber: Campbell & Landry 2006: 26, diterjemahkan sesuai aslinya.]

2.4.3. Isolasi dan Karakterisasi Virus Dengue

Deteksi dan karakterisasi virus dengue dilakukan dengan metode isolasi menggunakan kultur galur sel dan teknik inokulasi nyamuk. Saat ini, teknik isolasi virus dengue menggunakan galur sel lebih umum digunakan dibandingkan dengan teknik inokulasi nyamuk meskipun teknik inokulasi nyamuk memiliki sensitifitas yang lebih tinggi. Hal tersebut disebabkan karena isolasi menggunakan galur sel lebih ekonomis dan dapat digunakan untuk sampel dalam jumlah besar dengan waktu pengerjaan yang lebih cepat (Gubler 1998: 490; Shu & Huang 2004: 644).

Sel yang umum digunakan untuk mengisolasi virus dengue dari sampel klinis, yaitu sel nyamuk, diantaranya galur sel AP-61, Tra-284, C6/36, AP64, dan CLA-1. Sel mamalia juga dapat digunakan untuk mengisolasi virus dengue, diantaranya galur sel LLMCK2, Vero, dan BHK21. Namun, sel mamalia memiliki sensitifitas yang lebih rendah dibandingkan dengan sel nyamuk dalam isolasi virus dengue (Shu & Huang 2004: 643). Sementara itu, sel mamalia yang umum digunakan sel model infeksi virus dengue yaitu HepG2 (*human hepatocellular carcinoma*), 293/HEK-293 (*human embryonic kidney*) dan A549 (*human lung carcinoma*) (Marianneau *dkk.* 1996: 2548; Diamond *dkk.* 2000: 7815; Fink *dkk.* 2007: 2).

2.5. Teknik Kultur Sel

Kultur jaringan atau *tissue culture* adalah suatu teknik untuk mengisolasi sel, jaringan, dan organ, baik dari hewan maupun tumbuhan, kemudian memindahkannya ke dalam lingkungan buatan yang dapat mendukung pertumbuhannya (Ryan 2008: 1). Jenis kultur sel secara garis besar dibagi menjadi dua, yaitu kultur primer dan kultur galur sel (*cell lines*). Kultur primer adalah kultur yang menggunakan potongan organ atau jaringan yang diisolasi langsung dari suatu organisme. Sementara itu, kultur galur sel adalah kultur yang menggunakan sel yang imortal yang umumnya berasal dari sel tumor, sel yang telah ditransformasi secara *in vitro*, atau sel dari jaringan embrionik yang normal (Mather & Roberts 1998: 4 & 6).

Berdasarkan kemampuan sel untuk tumbuh melekat pada substrat kaca atau plastik, sistem kultur sel hewan dibedakan menjadi dua, yaitu sistem kultur monolayer dan sistem kultur suspensi. Sistem kultur monolayer atau *adherent cell* merupakan sistem kultur untuk sel yang hidup dengan melekat pada substrat. Sementara itu, sistem kultur suspensi merupakan sistem kultur untuk sel yang hidup tersuspensi pada medium (Ryan 1998: 3).

Berdasarkan morfologinya, sel hewan yang umum ditumbuhkan dalam kultur sel dibedakan menjadi tiga jenis, yaitu *epithelial-like*, *lymphoblast-like*, dan *fibroblast-like*. Sel *epithelial-like* merupakan sel yang menempel pada substrat dan berbentuk rata hingga poligonal. Sel *lymphoblast-like* merupakan sel yang tidak menempel pada substrat tetapi tersuspensi dalam medium dan berbentuk bola. Sementara itu, sel *fibroblast-like* adalah sel yang menempel pada substrat dan berbentuk memanjang hingga bipolar (Ryan 1998: 3; Butler 2005: 16). Beberapa contoh galur sel yang umum digunakan dalam kultur sel dapat dilihat pada Tabel 3.5.

Teknik dalam kultur sel secara garis besar dibedakan menjadi tiga, yaitu pencairan (*thawing*) dan pembekuan (*freezing*), serta subkultur (*subculturing*) (Mather & Roberts 1998: 64 & 81). Semua teknik kultur sel harus dilakukan secara aseptis untuk mencegah kontaminasi. Fungi dan bakteri adalah kontaminan

utama dalam kultur sel. Kontaminasi dapat diketahui dari penurunan pH medium yang drastis atau perubahan warna medium menjadi keruh (Butler 2005: 62).

Tujuan utama dalam pembekuan sel adalah untuk membuat persediaan sel dalam kultur *in vitro*. Selain itu, pembekuan sel juga bertujuan untuk meminimalisasi hilangnya sel karena kontaminasi, tidak terurus, kerusakan peralatan, dan bencana alam (Mather & Roberts 1998: 81). Pembekuan sel dilakukan menggunakan medium *freezing* yang mengandung krioprotektan, seperti 10% gliserol atau dimetil sulfoksida (DMSO). Krioprotektan berfungsi untuk melindungi sel dari kerusakan selama proses pembekuan dan pencairan. Sel akan stabil jika disimpan dalam nitrogen cair (-196°C). Namun, sebelum disimpan dalam nitrogen cair, sel ditempatkan terlebih dulu dalam kotak polistiren pada suhu -70°C untuk mencegah perubahan suhu yang drastis (Butler 2005: 50).

Tabel 2.5. Beberapa galur sel yang umum digunakan

Galur sel	Asal	Tipe sel
BHK	Ginjal bayi hamster	Fibroblas
CHO	Ovarium hamster Cina	Epitelial
HeLa	Kanker serviks manusia	Epitelial
L	Jaringan konektif tikus	Fibroblas
L6	Otot rangka tikus	Myoblas
MDCK	Ginjal anjing	Epitelial
MRC-5	Paru-paru manusia (embrionik)	Fibroblas
MPC-II	Mieloma tikus	Limfoblas
Namalwa	Limfoma manusia	Limfoblas
NB41A3	Neurblastoma tikus	Neuronal
3T3	Jaringan konektif tikus	Fibroblas
WI-38	Paru-paru manusia (embrionik)	Fibroblas
Vero	Ginjal monyet Afrika	Fibroblas

[Sumber: Butler 2005: 25, telah diolah kembali.]

Sel beku yang akan ditumbuhkan kembali dalam kultur sistem terlebih dahulu harus dicairkan. Proses pencairan sel dilakukan secara cepat dalam *waterbath* pada suhu 37°C untuk meminimalisasi sel yang mati. Sel yang beku terlalu lama dapat kehilangan viabilitasnya, sehingga pencairan, perbanyakan, dan

pembekuan sel kembali harus dilakukan secara periodik agar ketersediaan sel berkelanjutan (Mather & Roberts 1998: 81).

Subkultur dilakukan secara periodik untuk menyediakan nutrisi segar dan ruang untuk sel agar dapat terus tumbuh. Frekuensi untuk melakukan subkultur tergantung dari karakteristik setiap sel yang dikultur (Mather & Roberts 1998: 64). Langkah pengerjaan dalam subkultur melingkupi penggantian medium lama, pencucian *flask* atau cawan Petri, pelepasan sel yang menempel secara enzimatis, dan pendilusian suspensi sel dalam medium baru. Pelepasan sel yang menempel pada substrat secara enzimatis umumnya dilakukan menggunakan enzim proteolitik seperti tripsin untuk memutuskan ikatan antara protein sel dengan permukaan substrat (Butler 2005: 56).

2.6. Galur Sel C6/36, BHK21, Vero76, MDCK, 293, HepG2 dan A549

Kultur sel hewan berhasil dilakukan pertama kali oleh Ross Harison pada tahun 1907 (Ryan 2008: 1). Saat ini kultur sel hewan sudah banyak dilakukan untuk tujuan pembuatan vaksin virus, monoklonal antibodi dari sel hibridoma, dan protein rekombinan. Selain itu, kultur sel hewan dapat digunakan untuk propagasi atau perbanyakan virus (Butler 2005: 237 & 239).

Sel yang umum digunakan dalam propagasi dan isolasi virus, khususnya virus dengue antara lain galur sel C6/36 dan BHK21 (Shu & Huang 2004: 643). Galur sel C6/36 merupakan sel klon yang berasal dari larva nyamuk *Aedes albopictus*. Akira Igarashi adalah penemu dari galur sel C6/36 dan mengujinya untuk isolasi virus dengue dan chikungunya. Arti dari C6/36 yaitu C6 adalah sel klon ke enam yang digunakan dalam isolasi virus dan menghasilkan titer virus tertinggi dibandingkan 20 sel klon lainnya. Sementara itu, 36 adalah sel klon nomor 36 pada sel klon keenam yang menunjukkan efek sitopatik dari ringan hingga berat setelah beberapa hari pasca infeksi (Igarashi 1978: 534--535).

Sementara itu galur sel BHK21 adalah singkatan dari *baby hamster kidney* 21, yang berarti galur sel yang berasal dari ginjal bayi hamster. Bayi hamster yang digunakan berjenis *Syrian golden* dengan nama latin *Mesocricetus auratus*. Sel tersebut pertama kali diisolasi pada Maret 1961 dan merupakan sel fibroblast

normal dengan tipe pertumbuhan *adherent* atau menempel pada substrat (ATCC 2010a: 1).

Galur sel mamalia lain yang umum digunakan dalam studi virus patogen sebagai sel model, diantaranya Vero76, MDCK, HepG2, 293, dan A549

(Marianneau *dkk.* 1996: 2548; Diamond *dkk.* 2000: 7815; Fink *dkk.* 2007: 2).

Galur sel Vero76 berasal dari turunan sel Vero yang berasal dari ginjal *African green monkey* (*Cercopithecus aethiops*). Vero76 pertama kali diisolasi oleh K.M Johnson pada tahun 1968. Efek sitopatik dan *plaque* dapat terlihat pada sel tersebut jika diinfeksi dengan virus demam hemoragik (ATCC 2010b: 1).

Sementara itu, galur sel Madin-Darby *canine kidney* (MDCK) diturunkan dari sel ginjal normal anjing betina *cocker spaniel* (*Canis familiaris*). Galur sel MDCK pertama kali diisolasi oleh S.H. Madin dan N.B. Darby pada September 1958. Berdasarkan hasil uji imunoperoksidase sel tersebut positif menghasilkan keratin. Kedua jenis galur sel tersebut merupakan sel epitelial normal dengan tipe pertumbuhan sel *adherent* atau menempel pada substrat (ATCC 2010c: 1).

Galur sel HepG2, 293, dan A549 merupakan galur sel yang berasal dari manusia. Ketiga sel tersebut memiliki morfologi epitelial dengan tipe pertumbuhan *adherent*. HepG2 merupakan galur sel yang berasal dari sel kanker hati manusia. Sel tersebut diketahui mengekspresikan *3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase* dan *hepatic triglyceride lipase* (ATCC 2010d: 1).

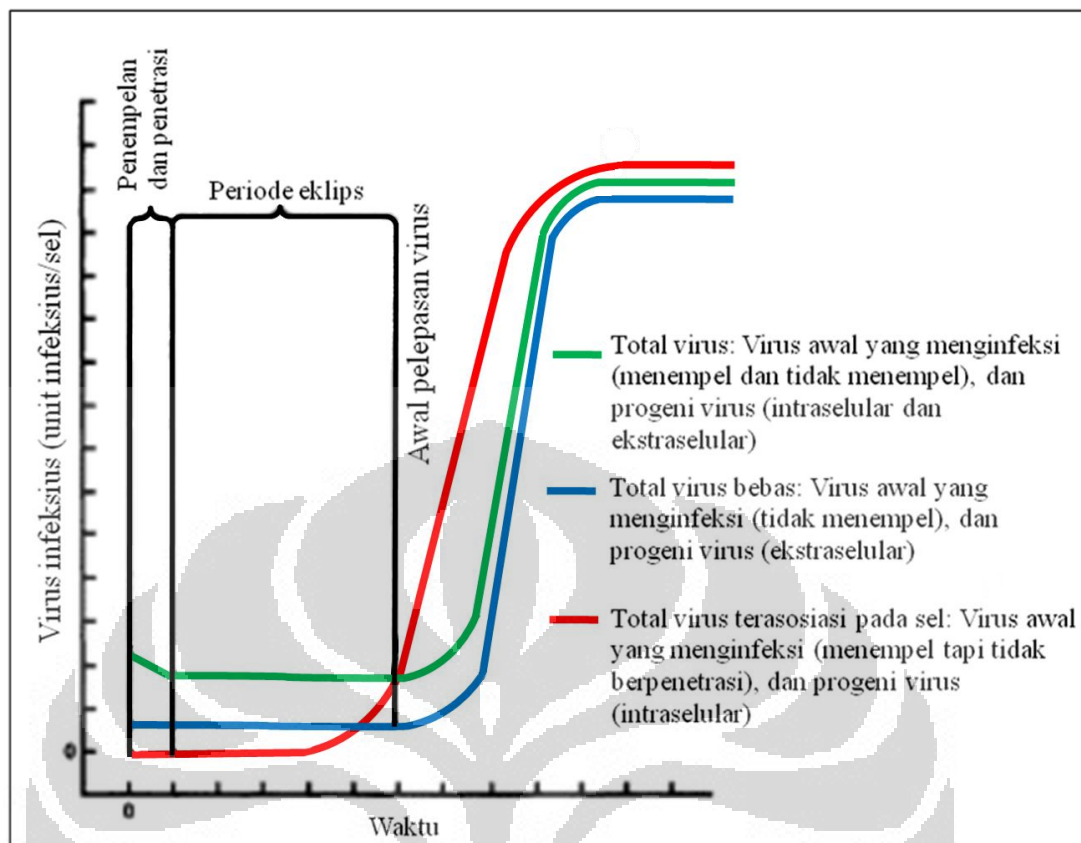
Galur sel 293 merupakan sel ginjal embrionik manusia yang memiliki insert DNA *Adenovirus* tipe 5 segmen NTS 1 hingga 4344 yang diintegrasikan pada kromosom 19q13,2. Sel tersebut diketahui mengekspresikan reseptor permukaan sel yang tidak biasa untuk vitronectin yang tersusun atas integrin beta-1 subunit and reseptor vitronectin yang tersusun atas alpha-v subunit (ATCC 2010e: 1). Galur sel A549 berasal dari sel kanker paru-paru manusia yang diisolasi pertama kali oleh D.J. Giard pada tahun 1972. Berdasarkan penelitian yang dilakukan M. Lieber, diketahui sel tersebut mampu mensintesis lektin dengan asam lemak tak jenuh berkonsentrasi tinggi melalui jalur *cytidine diphosphocholine*. Selain itu, sel A549 juga menghasilkan keratin berdasarkan pewarnaan imunoperoksidase (ATCC 2010f: 1).

2.7. Uji Pertumbuhan Kinetik

Replikasi virus pada hewan dapat dipelajari melalui uji pertumbuhan kinetik. Uji pertumbuhan kinetik dilakukan untuk mengetahui kecepatan replikasi virus dalam sel inang. Tingkat kecepatan replikasi virus merupakan salah satu parameter langsung untuk mengetahui virulensi virus (Rico-Hesse 2009: 2). Hal tersebut mendukung Vaughn *dkk.* (2000: 8) yang membuktikan bahwa kecepatan replikasi virus dengue yang tinggi dalam tubuh pasien berkorelasi positif dengan peningkatan keparahan penyakit dengue.

Uji kinetik dapat dilakukan pada sel kultur yang tumbuh baik secara suspensi maupun yang terikat atau monolayer. Uji tersebut dilakukan dengan cara menginfeksi sel kultur dengan tingkat *multiplicity of infection* (moi) tertentu. Pengambilan sampel kemudian dilakukan secara teratur pada selang waktu tertentu dan diikuti pengukuran titer virus ekstraseluler. Perbandingan antara titer virus dan waktu pengambilan sampel kemudian digambarkan dalam bentuk kurva pertumbuhan. Oleh karena itu, uji pertumbuhan kinetik juga disebut dengan *one-step growth curve* (Gambar 2.7) (Murphy *dkk.* 2008: 43).

Multiplicity of infection (moi) secara sederhana didefinisikan sebagai jumlah *plaque forming unit* (pfu) yang dibutuhkan untuk menginfeksi tiap sel. Nilai moi 1 berarti dibutuhkan 1 pfu untuk menginfeksi 1 sel, sehingga jika terdapat 10^6 sel yang akan diinfeksi maka jumlah pfu yang dibutuhkan adalah 10^6 . Nilai moi dapat bervariasi dari nol hingga nilai yang besar, tergantung pada konsentrasi virus pada stok virus, tipe eksperimen yang akan dilakukan, dan lain-lain (Wagner *dkk.* 2008: 166). Namun, nilai moi yang terlalu tinggi akan menghambat replikasi karena jumlah total partikel virus akan lebih tinggi dibandingkan jumlah virus infeksius (Wagner *dkk.* 2008: 167).



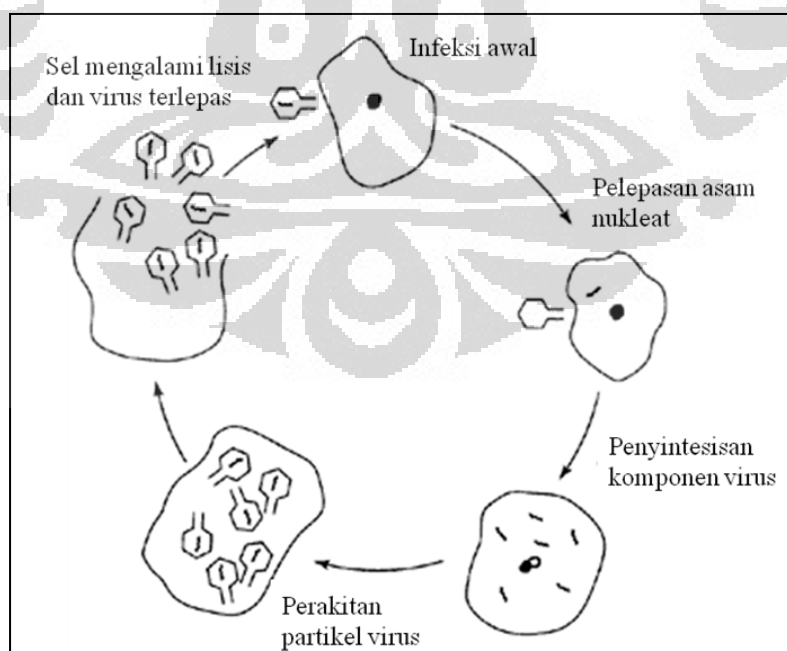
Gambar 2.7. Kurva pertumbuhan kinetik virus
[Sumber: Murphy *dkk.* 2008: 44, diterjemahkan sesuai aslinya.]

Virus yang diinokulasi tidak akan terdeteksi sesaat setelah infeksi, sehingga aktivitas virus infeksius tidak dapat terlihat. Periode tersebut disebut dengan periode eklips yang berlangsung hingga turunan pertama virus dapat terdeteksi. Umumnya periode eklips berkisar antara 2 hingga 12 jam setelah infeksi. Virus tanpa *envelope* akan menjadi dewasa di dalam sel, sehingga terdeteksi sebagai virus infeksius intraseluler sebelum dilepaskan melalui sel lisis. Hal tersebut berbeda dengan virus dengan *envelope* yang harus melalui proses *budding* dari membran plasma dari sel inang untuk mencapai kedewasaan. Oleh karena itu, virus jenis ini bersifat infeksius setelah dilepaskan ke medium melalui lisis sel (Murphy *dkk.* 2008: 43).

2.8. Metode Pengukuran Titer Virus

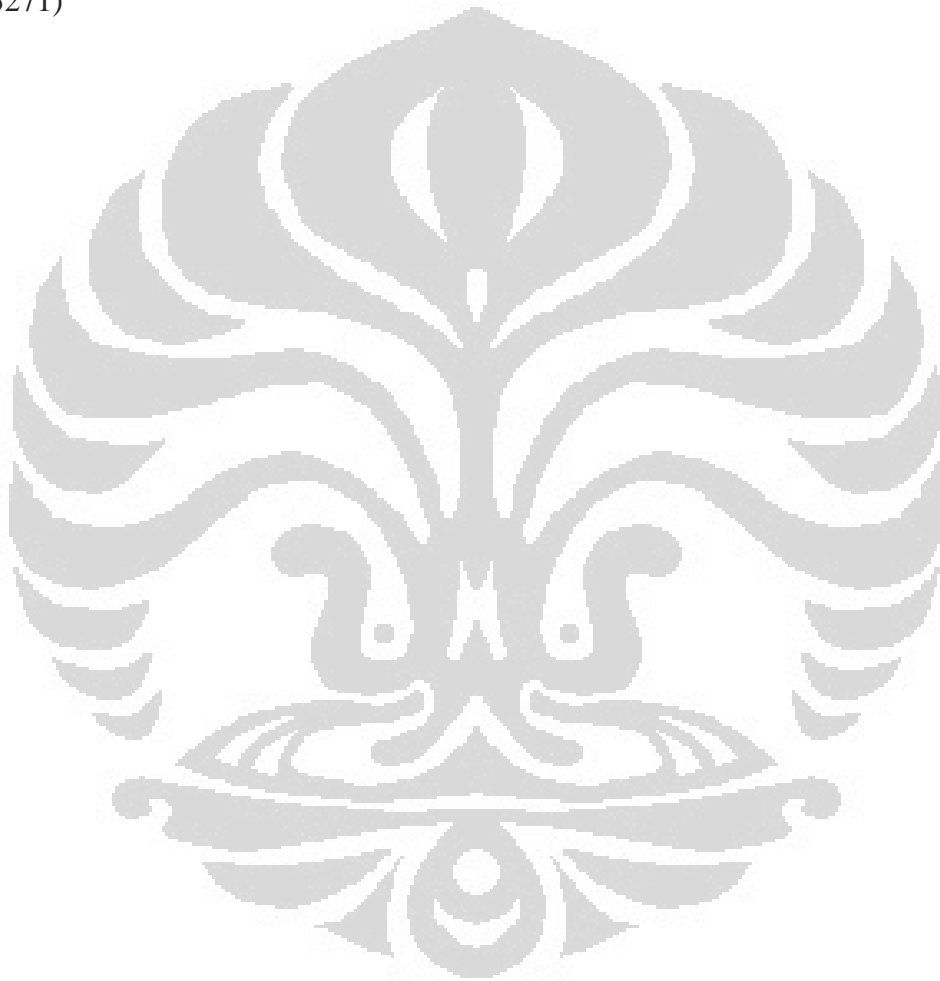
Metode standar untuk mengukur titer virus dengue adalah dengan menggunakan *plaque assay* (Lambeth dkk. 2005: 3267). *Plaque assay* telah terbukti merupakan metode yang sederhana dan akurat untuk merepresentasikan viabilitas virus (Herzog dkk. 2008: 2). Prinsip dari metode *plaque assay* adalah interaksi antara virus dengan sel inang. Sel inang yang digunakan dalam *plaque assay* umumnya adalah sel hewan yang pertumbuhannya bersifat *anchorage-dependent* atau sel yang tumbuh jika berikatan dengan substrat agar membentuk monolayer sel (Butler 2005: 239).

Konsentrasi virus dalam larutan atau titer ditentukan dengan membuat beberapa dilusi berseri dimana kemudian tiap seri dilusi tersebut diinokulasikan pada monolayer sel. Virus yang diinokulasikan pada sel monolayer akan menginfeksi sel, kemudian virus akan bereplikasi dan melisiskan sel (Gambar 2.8). Sel yang lisis pada monolayer sel karena infeksi virus tunggal akan terlihat sebagai satu zona bening, yang disebut dengan *plaque*. Jumlah pfu ditentukan dengan cara menghitung *plaque* yang terpisah atau masih dapat dibedakan yang terbentuk pada cawan (Voyles 2002: 24; Butler 2005: 239).



Gambar 2.8. Siklus lisis pada infeksi virus
[Sumber: Butler 2005: 240, diterjemahkan sesuai aslinya.]

Metode lainnya yang digunakan untuk mengukur titer virus adalah *fluorescence-activated cell sorter* (FACS). Keunggulan dari metode FACS adalah waktu pengerjaan yang lebih cepat yaitu 24 jam dibandingkan dengan metode *plaque assay* yang membutuhkan waktu 5--7 hari. Namun, metode FACS memiliki sensitivitas yang lebih rendah dibandingkan *plaque assay*. Hal tersebut disebabkan metode FACS tidak dapat mendeteksi titer virus dibawah 10^4 pfu/ml. Selain itu, FAC membutuhkan perlengkapan yang mahal (Lambeth *dkk.* 2005: 3271)



BAB 3 METODOLOGI PENELITIAN

3.1. Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian dilaksanakan di *Laboratorium Novartis-Eijkman Institute-Hasanuddin University Clinical Research Initiative (NEHCRI)*, Lembaga Biologi Molekuler Eijkman, Jakarta. Waktu pelaksanaan penelitian yaitu selama sembilan bulan dari Desember 2010 sampai Agustus 2011.

3.2. Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian adalah *Biological Safety Cabinet Class II (BSC II)* [ESCO], *37° C waterbath* [Mettler], inkubator 28°C [Mettler], inkubator CO₂ suhu 37° C [Sanyo], *motorized pipetor* [Bio-Rad], pipet serologis steril (5 ml, 10 ml, 25ml) [Corning], tabung sentrifuge (15 ml, 50ml) [Corning], rak tabung [Nalgene], mesin sentrifugasi SORVALL® RT 6000D, tabung kriogenik [Nunc], *flask kultur (T-25, T-75)* [Nunc, Falcon], mikroskop fase kontras CKX31 [Olympus], *repetitive pipet (100--1000 µl)* [Gilson], *Distritip Maxi ST (12,5 ml)* [Gilson], *24 wells plate* [Nunc], *vacuum pump* [Millipore], oven 50° C [Amersham Biosciences], tabung mikrosentrifuge 1,5 ml [Sorenson, Molecular BioProducts], tips steril [Axygen Scientific], *adjustable pipettor (2--20 µl, 20--200 µl, dan 100--1000 µl)* [Bio-Rad, Gilson], mesin vorteks REAX control [Heidolph], mesin sentrifugasi mini [Profuge 6K], mesin sentrifuge SORVALL® pico [Thermo], *timer*, tabung koleksi [QIAGEN], *QIAamp Mini spin column* [QIAGEN], *waste container*, mesin *thermal cycler GeneAmp® PCR system 9700* [Applied Biosystem], *UV PCR cabinet* [SCIE-PLAS], tabung PCR [Sorenson, Molecular BioProducts], rak tabung, kotak es, sarung tangan [Ansell], parafilm [Whatman], gunting, *plastic wrap* [Kinpak, Bagus], tabung erlenmeyer [Schott], komputer [DELL], *microwave* [Sharp], *Gel-Doc gel documentation system* [Bio-Rad], *electrophoresis apparatus system*

[Bio-Rad], *power supply* [Bio-Rad], *Imm lux 96 wells plate* [Nunc], *ELISA ELx50 plate-washer* [Biotek], *ELISA ELx808 plate-reader* [Biotek], *plate sealer* [Nunc], dan *improved Neubauer haemocytometer*.

3.3. Bahan

3.3.1. Sampel

Sampel yang digunakan dalam penelitian adalah isolat empat serotipe virus dengue referensi dan tujuh jenis galur sel yang merupakan koleksi laboratorium NEHCRI. Empat serotipe virus dengue yang digunakan, yaitu D1-Westpac (U88535.1), D2-TSV01 (AY037116.1), D3-H87 (M93130.1), dan D4-H241 (AY947539.1). Sementara itu, tujuh jenis galur sel yang digunakan, yaitu C6/36, Vero76, MDCK, 293, HepG2, A549 dan BHK21. Galur sel BHK21 digunakan sebagai sel inang dalam *plaque assay*. Virus dengue referensi dan galur sel yang digunakan berasal dari stok beku yang disimpan pada *freezer* suhu -80°C dan nitrogen cair (-196°C). Media penyimpanan virus berupa medium 1XRPMI 1640-2% FBS-1% *Penicillin/Streptomycin*, sedangkan media penyimpanan galur sel berupa 1XRPMI 1640-10% FBS-1% *Penicillin/Streptomycin* dan dimetil sulfoksida (DMSO) dengan konsentrasi akhir 10% sebagai krioprotektan.

3.3.2. Medium

Medium yang digunakan dalam penelitian adalah 1X RPMI 1640 mengandung 2 mM L-glutamine [Gibco] dan disuplementasi 10% (v/v) Fetal Bovine Serum/FBS [Gibco], 100 U/ml *Penicillin* dan 100 µg/ml *Streptomycin* [Gibco]. Medium ini disebut medium lengkap 1X RPMI 1640-10% FBS-1% *Penicillin/Streptomycin*. Medium lain yang digunakan adalah 1X RPMI 1640-2% FBS-1% *Penicillin/Streptomycin* [Gibco], 1% *methylcellulose overlay* [Merck Calbiochem]-2% FBS, dan *freezing medium* yang terdiri atas 1X RPMI 1640-10% FBS-1% *Penicillin/Streptomycin*-10% DMSO.

3.3.3. Bahan Lain

Bahan lain yang digunakan dalam penelitian adalah, 1X 0,25% Tripsin-EDTA [Gibco], *phosphate buffer saline* (PBS) pH 7,4 tanpa CaCl₂ dan MgCl₂ [Gibco], dimetil sulfoksida (DMSO) [AppliChem], 3,7% formalin [Appllichem], 1% *crystal violet* [Sigma], 70% etanol, dan 10% *bleach*.

Beberapa tahap dalam penelitian menggunakan kit komersial yaitu ekstraksi RNA menggunakan *QIAamp[®] viral RNA mini kit* [QIAGEN]. Reverse transcriptase untuk pembentukan cDNA dari RNA virus menggunakan *SuperScript[®] III reverse transcriptase kit* [Invitrogen], *nested-multiplex PCR* menggunakan *HotStar Taq DNA polymerase kit* [QIAGEN] dan uji ELISA menggunakan *Platelia[®] Dengue NS1 Ag* [Bio-Rad]. Rincian bahan-bahan dalam kit komersial dapat dilihat pada Lampiran 1. Primer yang digunakan disajikan pada Lampiran 2.

3.4. Cara Kerja

3.4.1. Kultur Sel (C6/36, BHK21, Vero76, MDCK, 293, HepG2 dan A549)

Persiapan galur sel dilakukan melalui tiga tahap yaitu *resuscitation*, subkultur, dan *frozen stock*. Tahapan kerja dalam kultur galur sel dilakukan berdasarkan *standard operational procedure* (SOP) NEHCRI, yaitu:

3.4.1.1. Pencairan Stok Sel Beku (*Thawing*)

Medium 1X RPMI 1640 lengkap yang mengandung 10% FBS dan 1% *Penicillin/Streptomycin* disiapkan dan dihangatkan pada 37° C *waterbath*. Medium lengkap yang telah dihangatkan selama kurang lebih 15 menit diambil sebanyak 10 ml dan ditempatkan dalam tabung sentrifuge 15 ml. Tabung kriopreservasi berisi galur sel diambil dari -196°C kemudian secara cepat dicairkan pada 37° C *waterbath*. Selama proses pencairan tabung tidak boleh diguncang karena pada tahap ini sel sangat rapuh. Suspensi sel yang sudah

mencair secara cepat dipindahkan ke tabung sentrifuge berisi medium yang telah disiapkan, kemudian disentrifuge selama 5 menit dengan kecepatan 1000 rpm pada suhu ruang.

Supernatan dibuang dari tabung kemudian ditambahkan 5 ml medium dan pelet diresuspensikan secara perlahan. Suspensi sel kemudian dipindahkan ke dalam T25 *flask* (*non filter cap*) kemudian *flask* diberi label nama sel, *passage number* (P1), tanggal *resuscitate*, dan inisial. Tutup *flask* dikencangkan kemudian *flask* ditempatkan pada inkubator dengan suhu 28 °C untuk sel C6/36. Tutup *flask* setengah dikencangkan kemudian ditempatkan pada inkubator dengan suhu 37 °C dan suplementasi 5% CO₂ untuk sel BHK21, Vero76, HepG2, 293, dan A549. Sel diperiksa setiap hari dan apabila *flask* sudah tertutupi dengan lapisan monolayer sel maka sel harus disubkultur.

3.4.1.2. Subkultur

Medium dalam *flask* dibuang dengan menggunakan pipet. Untuk *flask* T25, ditambahkan sebanyak 5ml *Phosphate buffer saline* (PBS) tanpa Mg⁺ dan Ca²⁺ kemudian *flask* digoyang hingga seluruh permukaan monolayer sel tercuci. Setelah itu, PBS tersebut dibuang menggunakan pipet. 1X 0,25% Tripsin-EDTA sebanyak 0.5 ml ditambahkan ke dalam *flask* menggunakan pipet baru kemudian tripsin dibiarkan menutupi semua monolayer sel pada permukaan *flask*. Monolayer sel diperiksa tiap 10 detik seiring dengan *flask* digerakan ke depan dan ke belakang. Monolayer sel dilihat secara seksama untuk mencari *pinpoint* yang ditandai dengan daerah bening akibat dari sel yang terlepas. Tripsin yang berada dalam *flask* segera dibuang sebanyak dua pertiga bagian saat terlihat *pinpoint*, kemudian sisi-sisi *flask* dipukul secara hati-hati hingga semua sel terlepas.

Sebanyak 15 ml medium ditambahkan secara cepat ke dalam *flask*. Suspensi sel dipipet naik turun beberapa kali kemudian dipindahkan ke dua T25 *flask* baru, tiap *flask* sebanyak 5 ml (*split ratio* 1:3). *Flask* diberi label nama sel, *passage number*, tanggal subkultur, dan inisial. Setelah itu, *flask* ditempatkan pada inkubator dengan suhu 28° C untuk sel C6/36 dengan tutup *flask* dikencangkan dan pada inkubator dengan suhu 37° C dan suplementasi 5% CO₂

untuk sel BHK21, Vero76, HepG2, 293, dan A549 dengan tutup *flask* setengah dikencangkan. *Flask* pada umumnya akan dipenuhi sel setelah dua hari inkubasi pada *split ratio* 1:3, dan tiga hari pada *split ratio* 1:4.

3.4.1.3. Pembuatan Stok Sel Beku (*Freezing*)

Satu T75 *flask* yang sudah dipenuhi sel diambil dan disubkultur seperti cara di atas. Setelah semua sel terlepas, *flask* ditambahkan 10 ml medium dan sel disuspensikan dengan cara dipipet naik turun. Suspensi sel dipindahkan ke dalam tabung sentrifuge 15 ml kemudian disentrifuge selama 5 menit dengan kecepatan 1000 rpm pada suhu ruang.

Supernatan dibuang kemudian sel diresuspendikan dalam 5 ml *freeze-buffer* yang mengandung 9 ml 1X RPMI 1640-10%FBS, dan 1 ml (10%) DMSO, kemudian dipindahkan ke dalam 3 tabung kriopreservasi 1,8 ml sebanyak 1,5 ml tiap tabung. Tabung diberi label nama sel, *passage number*, tanggal produksi, dan inisial kemudian dibuat laporan pada *cell freeze stock archives*. Tabung ditempatkan pada *Mr. Frosty* selama 4 jam kemudian tabung ditempatkan pada *freeze stock boxes*. Setelah itu, tabung disimpan pada -80°C *freezer* semalaman kemudian dipindahkan ke nitrogen tank berisi nitrogen cair (-196°C).

3.4.2. Uji Pertumbuhan Kinetik Virus Dengue dalam Enam Galur Sel

Uji pertumbuhan kinetik bertujuan untuk mengetahui kecepatan replikasi empat serotipe virus dengue pada enam galur sel. Pengujian dilakukan dalam 1 *batch* dengan dua pengulangan (*duplo*). Uji kinetik dilakukan melalui tiga langkah utama, yaitu penanaman sel (*seeding*), infeksi, dan pengambilan sampel (12, 24, 36, 48, 60, 72 jam). Langkah pertama dalam uji kinetik adalah penanaman sel pada 24 *wells plate* dengan jumlah sel 5×10^5 per *well*. Tiap galur sel yang telah ditumbuhkan dalam *flask* T75 disubkultur seperti biasa. Setelah ditripsinisasi, sel disuspensikan dalam 5 ml medium lengkap (1X RPMI 1640-10% FBS-1% Penicillin/Sterptomycin) yang telah dihangatkan sebelumnya

Sel kemudian dihitung menggunakan *hemocytometer*, yaitu kamar hitung Improved Neubauer. Metode penghitungan sel dilakukan berdasarkan Sambrook *dkk.* (A8.6--A8.7). Sebanyak 20 μl suspensi sel dicampurkan ke dalam 180 μl medium (dilusi 1:10) yang telah disiapkan pada tabung 1,5 ml. Penghitungan sel kemudian dilakukan pada 5 kotak besar di tiap *chamber*, sehingga total kotak yang dihitung adalah 10 kotak. Volume suspensi yang dimasukkan dalam tiap *chamber* yaitu 10 μl dan sel diamati menggunakan mikroskop dengan perbesaran 10x10. Setelah sel pada ke-10 kotak dihitung, jumlah sel total dihitung menggunakan rumus:

$$\text{Jumlah sel (sel/ml)} = \frac{\text{Jumlah sel yang terhitung}}{\text{Jumlah kotak yang dihitung} \times 10^{-4}} \times \text{faktor dilusi}$$

Berdasarkan perhitungan tersebut, dilakukan perhitungan selanjutnya untuk menentukan volume inokulum sel pada tiap *well* agar didapatkan 5×10^5 sel per *well*. Pada tiap *well* ditambahkan 1 ml medium lengkap kemudian inokulum sel yang telah ditentukan volumenya ditambahkan pada tiap *well* menggunakan pipet. Tiap jenis galur sel ditanamkan ke dalam 6 *well*, sehingga dalam satu *plate* terdapat 4 jenis galur sel. *Plate* kemudian diinkubasi semalaman pada suhu 28°C untuk sel C6/36 dan suhu 37°C dengan aliran CO₂ untuk sel Vero76, MDCK, HepG2, 293, dan A549.

Keesokan harinya, sel diperiksa kepadatannya dan hanya sel dengan tingkat kepadatan 80--100% yang akan diinfeksi. Tiap serotipe virus dengue akan menginfeksi enam jenis galur sel. Stok beku virus dengue referensi (D1--4) yang akan diinfeksi dan telah diketahui titernya dicairkan dalam *waterbath* pada suhu 37°C. Setelah itu, dibuat perhitungan volume inokulum tiap serotipe virus dalam medium 1X RPMI 1640-2%FBS-1% *Penicillin/Streptomycin* yang telah dihangatkan yang akan diinfeksi pada 5×10^5 sel per *well* agar dicapai *multiplicity of infection* (moi) 0,01. Medium lama pada *plate* dibuang, lalu diinokulasikan 200 μl suspensi virus pada tiap *well*. *Plate* kemudian diberi label jenis virus, tipe galur sel, dan *timepoint*. *Plate* kemudian diinkubasi selama 1 jam

pada suhu 28°C untuk sel C6/36 dan suhu 37°C dengan aliran 5% CO₂ untuk sel Vero76, MDCK, HepG2, 293, dan A549.

Setelah masa inkubasi 1 jam untuk adsorpsi virus, inokulum pada tiap *well* diambil menggunakan *vacuum pump*. Untuk pencucian sel, setiap *well* ditambahkan medium 1X RPMI 1640-2% FBS-1% *Penicillin/Streptomycin* sebanyak 500 µl, lalu medium tersebut dibuang kembali menggunakan *vacuum pump*. Sebanyak 500 µl medium baru kemudian ditambahkan pada tiap *well* dan *plate* diinkubasi pada suhu 28°C untuk sel C6/36 dan suhu 37°C dengan aliran 5% CO₂ untuk sel Vero76, MDCK, HepG2, 293, dan A549.

Pengambilan sampel dilakukan pada selang waktu 12 jam setelah infeksi selama 72 jam, yaitu 12, 24, 36, 48, 60, dan 72 jam. Pengambilan sampel dilakukan dengan mengambil supernatan virus dalam medium pada tiap *well* berdasarkan *timepoint*. Sampel pada tiap *timepoint* dikoleksi dalam tabung kriopreservasi, diberi label jenis virus, tipe galur sel, dan *timepoint*, kemudian disimpan dalam *freezer* -80°C.

3.4.3. *Enzyme-linked Immunoabsorbant Assay* (ELISA) untuk Deteksi Protein NS1

Uji ELISA dilakukan dengan menggunakan kit komersial *Platelia*[®] *Dengue NS1 Ag* dari Bio-Rad. Langkah-langkah ekstraksi RNA disesuaikan dengan prosedur pada buku panduan *Platelia*[®] *Dengue NS1 Ag* (Bio-Rad 2008: 8-10). Persiapan sampel dilakukan dengan mencampurkan masing-masing supernatan virus dari tiap pengulangan hasil uji kinetik (1 dan 2). Supernatan virus kemudian dipaparkan dengan sinar ultraviolet (UV) untuk menginaktivasi virus.

Langkah pertama adalah mikroplate yang masih tersegel dibawa ke suhu ruang (18--30°C) kemudian mikroplate dikeluarkan dari plastik pelindung vakum yang tertutup rapat tersebut. Mikroplate lalu ditempatkan pada rak. Larutan diluen R7 kemudian ditambahkan sebanyak 50 µl pada setiap *well*. Sampel (kontrol negatif/R3, kalibrator /R4, kontrol positif/R5, atau sampel uji) ditambahkan sebanyak 50 µl pada tiap *well*.

Larutan konjugat (R6) didilusi 50x dalam larutan diluen (R7). Larutan konjugat yang telah didilusi (R6+R7) kemudian ditambahkan sebanyak 100 µl pada tiap well. Mikroplate kemudian ditutup menggunakan *adhesive plate sealer* dan ditekan untuk meyakinkan *sealer* tertutup rapat. Mikroplate kemudian di inkubasi selama 90 menit pada suhu 37°C. Larutan pencuci (R2) disiapkan lalu didilusikan 20x dalam akuabides. Pada akhir masa inkubasi *sealer* dibuka lalu cairan dalam tiap well dibuang pada tempat pembuangan biohazard yang mengandung sodium hipoklorida. Mikroplate dicuci sebanyak enam kali menggunakan larutan pencuci, lalu dibalik dan diketuk secara perlahan pada kertas tisu untuk membuang cairan yang tersisa.

Larutan kromogen (R9) secara cepat ditambahkan sebanyak 160 µl pada tiap well. Mikroplate kemudian diinkubasi pada suhu ruang (18--30°C) selama 30 menit dalam kondisi gelap agar reaksi dapat berlangsung. Reaksi enzimatis dihentikan dengan cara sebanyak 100 µl *stopping solution* (R10) ditambahkan pada tiap well. Bagian bawah mikroplate dibersihkan secara hati-hati. *Optical density* (OD) sampel dibaca menggunakan *plate reader* pada panjang gelombang 450/620 nm dalam waktu 30 menit setelah penambahan *stopping solution*.

3.4.4. *Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction* (RT-PCR)

3.4.4.1. Ekstraksi RNA dari Supernatan Virus Dengue

Ekstraksi RNA dilakukan dengan menggunakan kit komersial *QIAamp*[®] *viral RNA mini kit*. Langkah-langkah ekstraksi RNA disesuaikan dengan prosedur pada *QIAamp*[®] *viral RNA mini handbook* (QIAGEN 2005: 23--25). Langkah pertama adalah AVL *buffer* sebanyak 560 µl dimasukkan ke dalam tabung mikrosentrifuge 1,5 ml. *Carrier* RNA sebanyak 5,6 µl kemudian ditambahkan kedalam AVL *buffer*, kemudian dipipet naik turun. Supernatan sampel referensi virus dengue sebanyak 140 µl ditambahkan ke dalam AVL *buffer-carrier* RNA pada tabung mikrosentrifuge. Tabung tersebut kemudian divorteks selama 15 detik dan diinkubasi selama 10 menit pada suhu ruang, kemudian disentrifugasi secara singkat.

Etanol 96%--100% sebanyak 560 µl ditambahkan pada sampel dan divorteks selama 15 detik, kemudian disentrifugasi secara singkat. Larutan tersebut sebanyak 630 µl dimasukkan ke *QIAamp Mini spin column* yang terdapat di dalam *tabung koleksi* 2 ml secara hati-hati tanpa membasahi dinding *spin column*. Tabung tersebut kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 8000 rpm selama 1 menit. Tabung koleksi berisi filtrat dibuang, kemudian *QIAamp Mini spin column* dipindahkan ke tabung koleksi 2 ml yang baru. Tahap tersebut diulangi sampai semua larutan diisikan ke dalam *spin column*.

Tahap selanjutnya yaitu AW1 *buffer* sebanyak 500 µl dimasukkan ke dalam *spin column* secara hati-hati, kemudian tabung disentrifuge dengan kecepatan 8000 rpm selama 1 menit. Tabung koleksi berisi filtrat dibuang, kemudian *spin column* dipindahkan ke tabung koleksi 2 ml yang baru. AW2 *buffer* sebanyak 500 µl dimasukkan ke dalam *spin column* secara hati-hati, kemudian tabung disentrifuge dengan kecepatan 13.000 rpm selama 3 menit. Tabung koleksi berisi filtrat dibuang, kemudian *spin column* dipindahkan ke tabung mikrosentrifuge 1,5 ml yang baru.

Tabung tersebut disentrifuge kembali dengan kecepatan 13.000 rpm selama 1 menit. Tabung koleksi berisi filtrat dibuang, kemudian *spin column* dipindahkan ke tabung mikrosentrifuge 1,5 ml yang baru. AVE *buffer* sebanyak 60 µl dimasukkan ke dalam *spin column* secara hati-hati, kemudian diinkubasi selama 1 menit pada suhu ruang. Tabung kemudian disentrifuge dengan kecepatan 8000 rpm selama 1 menit. Filtrat yang didapat merupakan RNA dan disimpan pada suhu -80°C.

3.4.4.2. *Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction* (RT-PCR) untuk Deteksi Virus Dengue

Tahapan kerja RT-PCR dilakukan berdasarkan SOP NEHCRI yang merupakan adaptasi dari Lanciotti *dkk.* (1992: 546). Semua komponen yang diperlukan untuk membuat *master mix* (Lampiran 3) disiapkan kemudian dimasukkan ke dalam kotak es. *Master mix* I dibuat di dalam UV PCR cabinet berdasarkan perhitungan yang telah dilakukan. Komponen yang pertama kali

dimasukkan ke dalam 1,5 ml tabung mikrosentrifugasi adalah ddH₂O sebanyak hasil perhitungan, kemudian ditambahkan komponen lainnya.

Larutan *master mix* I yang telah dibuat dipindahkan ke beberapa tabung PCR baru sebanyak 9 µl tiap tabung. RNA hasil ekstraksi kemudian ditambahkan sebanyak 6 µl ke dalam tiap tabung PCR, lalu tabung divorteks dan disentrifugasi beberapa saat. Penambahan RNA dilakukan di luar UV PCR cabinet. Tabung PCR kemudian dimasukkan ke dalam *thermal cycler*, siklus RT-PCR kemudian dijalankan sesuai program yang telah dibuat berdasarkan SOP NEHCRI.

Setelah PCR berjalan selama 5 menit pada suhu 65° C, tabung PCR dikeluarkan dari *thermal cycler* kemudian ditempatkan pada kotak es. *Master mix* II dibuat di dalam UV PCR cabinet dengan menambahkan komponen-komponen yang diperlukan di dalam tabung mikrosentrifuge. Larutan *master mix* II kemudian dimasukkan ke dalam tiap tabung PCR berisi RNA sebanyak 5 µl. Tabung PCR kemudian dimasukkan ke dalam mesin *thermal cycler* kembali dengan siklus yaitu 25° C selama 5 menit, 42° C selama 60 menit, 70° C selama 15 menit, dan 4° C sampai tak terhingga. Produk hasil PCR merupakan cDNA dan disimpan pada suhu -20° C.

Produk hasil reaksi *reverse transcription* kemudian diamplifikasi melalui proses PCR. Semua komponen PCR yang diperlukan untuk membuat *master mix* (Lampiran 4) disiapkan kemudian dimasukkan ke dalam kotak es. *Master mix* dibuat di dalam UV PCR cabinet berdasarkan perhitungan yang telah dilakukan. Larutan *master mix* yang telah dibuat dipindahkan ke beberapa tabung PCR baru sebanyak 23 µl tiap tabung. Produk hasil reaksi *reverse transcriptase* (cDNA) kemudian ditambahkan sebanyak 2 µl ke dalam tiap tabung PCR berisi *master mix*, kemudian tabung divorteks dan disentrifuge beberapa saat.

Mesin *thermal cycler* dinyalakan kemudian siklus PCR untuk deteksi virus dengue dijalankan sesuai program yang telah dibuat berdasarkan SOP NEHCRI. Tabung PCR kemudian dimasukkan ke dalam *thermal cycler* sebanyak 40 siklus, dengan rincian tiap siklusnya yaitu denaturasi awal dan aktivasi enzim pada suhu 95° C selama 15 menit; 40 siklus terdiri dari 95° C selama 30 detik, *annealing* 60° C selama 1 menit, 72° C selama 1 menit 30 detik, tahap elongasi final pada suhu

72°C selama 10 menit, dan 4°C sampai tak terhingga. Hasil PCR kemudian divisualisasi dengan elektroforesis menggunakan gel agarosa 2%. Keberadaan asam nukleat virus dengue ditandai dengan terbentuknya pita berukuran 271 pb.

3.4.4.3. Elektroforesis Gel Agarosa

Elektroforesis dilakukan menggunakan gel agarosa dengan konsentrasi 2%. Pembuatan gel agarosa 2% berukuran besar dilakukan dengan menimbang 2 gr bubuk agarosa kemudian dilarutkan dalam 100 ml 1X *TBE buffer* pada tabung erlenmeyer. Sementara itu, gel berukuran kecil dibuat dengan melarutkan 1 gr dalam 50 ml *TBE buffer*. Mulut tabung ditutup dengan *plastic wrap* kemudian dimasukkan ke dalam *microwave*. Cetakan gel dipersiapkan selama pemanasan agar. Jika larutan agar mendidih tabung erlenmeyer dikeluarkan dari *microwave* dan tabung digoyangkan untuk menghomogenisasi bubuk agar, kemudian dimasukkan kembali dalam *microwave*. Langkah tersebut diulangi hingga bubuk agarosa larut.

Larutan agarosa kemudian diturunkan suhunya dengan cara mengaliri bagian luar dinding tabung erlenmeyer dengan air mengalir. Etidium bromida (EtBr) kemudian ditambahkan ke dalam larutan agarosa dengan konsentrasi akhir 0,2 µg/ml, yaitu sebanyak 2 µl EtBr stok (10 mg/ml) untuk gel bervolume 100 ml larutan agarosa, dan 1 µl EtBr stok untuk gel bervolume 50 ml larutan agarosa. Tabung kemudian digoyangkan sampai etidium bromida terlarut sempurna. Larutan agarosa kemudian dicetak pada cetakan gel, ditunggu hingga mengeras.

Gel agarosa yang telah mengeras dipindahkan ke dalam *electrophoresis chamber* yang berisi *TBE buffer*. Sisir pada gel kemudian diangkat secara hati-hati. *Loading dye* sebanyak 4 µl dan 16 µl sampel dihomogenisasi pada parafilm, kemudian dimasukkan ke dalam *well* hingga semua sampel habis. Sementara itu, DNA *ladder* sebanyak 5 µl dimasukkan ke dalam *well*. Elektroforesis dijalankan pada tegangan 120 V selama 1 jam untuk gel bervolume 100 ml, sedangkan untuk gel bervolume 50 ml dijalankan pada tegangan 90V selama 45 menit. Hasil elektroforesis divisualisasikan menggunakan GelDoc *gel documentation* Bio-Rad.

3.4.5. Pengukuran Titer Virus dengan *Plaque Assay*

Protokol kerja yang dilakukan dalam pengukuran titer virus dengue dengan *plaque assay* dilakukan berdasarkan SOP NEHCRI. Langkah pertama yaitu *flask* T75 yang sudah penuh dengan monolayer sel BHK21 (10^7 sel) yang telah disubkultur dua sampai tiga hari sebelumnya diambil dari inkubator. Sel disubkultur seperti biasa dan diresuspensikan dalam 30 ml medium yang mengandung 1X RPMI 1640-10% FBS-1% *Penicillin/Streptomycin*. Suspensi sel sebanyak 0,6 ml (2×10^5 sel) dimasukkan ke dalam tiap *well* pada 24 *wells plate* dengan menggunakan *stepper* pipet steril. *Plate* diinkubasi dalam inkubator pada suhu 37°C -5% CO_2 semalaman.

Keesokan harinya kepadatan sel monolayer diperiksa, hanya kepadatan sel monolayer yang mencapai 80--100% yang akan digunakan selanjutnya. Sampel virus kemudian dibuat serial dilusinya sebanyak 6 seri, dari 10^{-1} sampai 10^{-6} . Pembuatan dilusi berseri dilakukan dengan cara memindahkan sebanyak 450 μl medium 1X RPMI 1640-2% FBS-1% *Penicillin/Streptomycin* pada tiap 6 tabung mikrosentrifuge yang telah disiapkan.

Sampel virus kemudian dicairkan pada inkubator dan diambil sebanyak 50 μl , kemudian dimasukkan ke tabung seri pertama (10^{-1}) yang telah berisi medium. Tabung kemudian divorteks dan 50 μl dari suspensinya dipindahkan ke tabung seri kedua (10^{-2}), tahap tersebut diulangi hingga tabung seri terakhir. Enam tabung serial dilusi kemudian divorteks semua untuk terakhir kali. Enam tabung serial dilusi diperuntukkan untuk satu jenis virus.

Medium dalam *plate* dibuang tetapi tidak perlu dikeringkan dan ditambahkan secara cepat 200 μl sampel yang telah diserial dilusi ke tiap *well* tanpa mengganggu sel berdasarkan urutan dilusinya. Tiap seri dari dilusi dilakukan pengulangan sebanyak dua kali (*duplo*). *Plate* diinkubasi dalam inkubator 37°C -5% CO_2 selama 1 jam dengan digoyangkan tiap 20 menit.

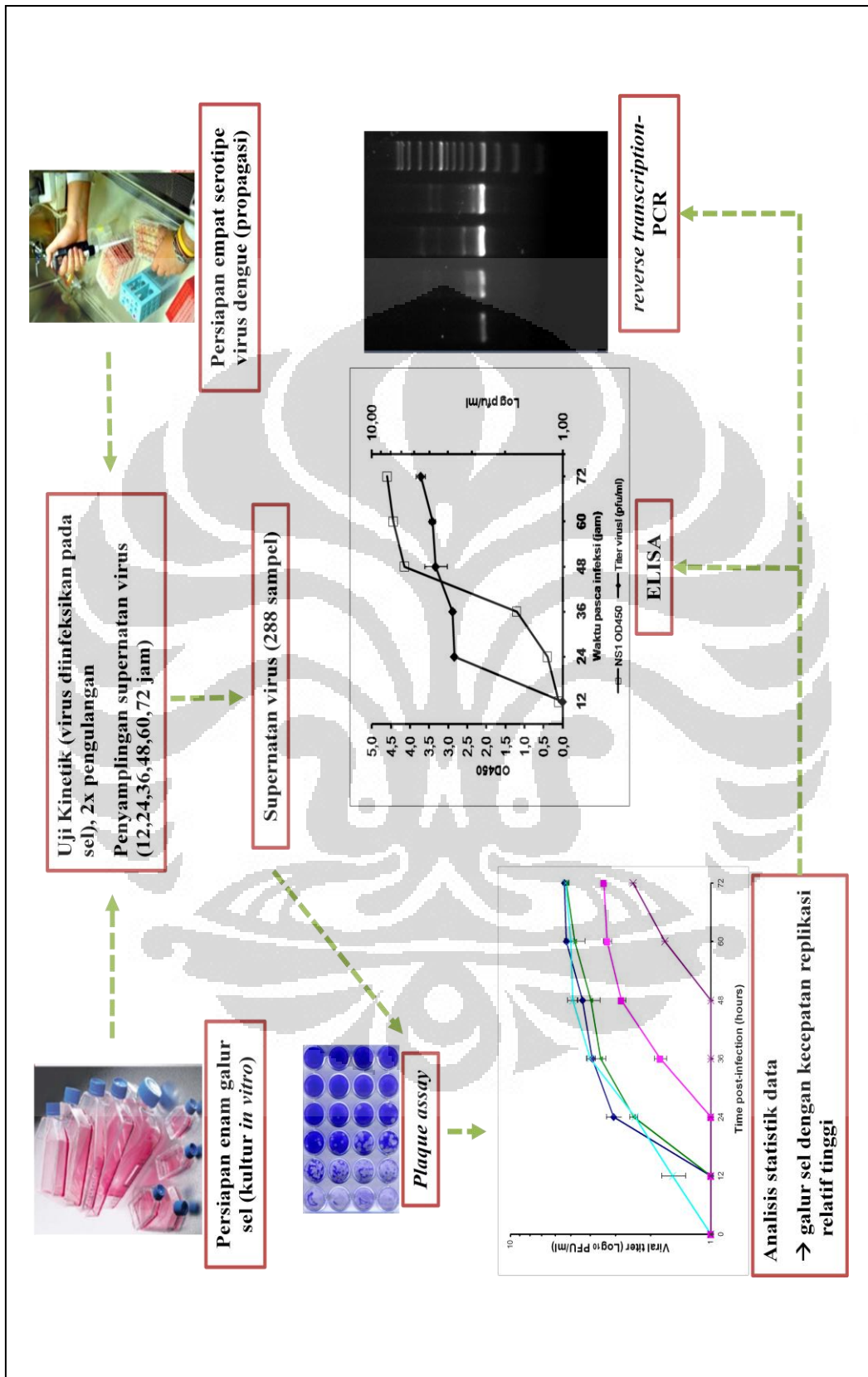
Sampel virus pada tiap *well* dikeluarkan dengan menggunakan *vacuum pump*, mulai dari dilusi yang berkonsentrasi rendah hingga tinggi. 1% *methylcellulose overlay* -2% FBS yang telah dihangatkan ditambahkan secara cepat sebanyak 0,5 ml ke dalam tiap *well* menggunakan *repetitive pipet* dan

distritips steril tanpa mengganggu sel. *Overlay* dikocok terlebih dahulu sebelum digunakan. *Plate* diinkubasi dalam inkubator 37°C-5% CO₂ selama 6 hari dan tidak boleh diganggu selama inkubasi.

Pada akhir periode inkubasi, *plate* dimasukkan ke dalam tangki berisi 3,7% formalin. *Plate* dibuka di dalam tangki dan *well* dibilas dengan formalin untuk menghilangkan lapisan lengket dan dipastikan tidak ada lapisan yang tertinggal pada permukaan sel. *Plate* disimpan dalam formalin selama 30 menit untuk fiksasi sel. *Plate* dibilas dengan air mengalir dan dikeringkan secara cepat.

Crystal violet 1% ditambahkan secukupnya sampai menutupi permukaan lapisan sel dan didiamkan selama 5 menit. *Plate* dicuci dengan air mengalir dan dikeringkan dengan oven pada suhu 50°C selama 30 menit. *Plate* dijauhkan atau dihindari dari paparan cahaya matahari langsung, jika tidak zat pewarna akan memudar. Jumlah *plaque* dalam *well* dihitung yang mengandung 3–20 *plaque*. Berdasarkan Mahy dan Kangro (1996: 38), titer virus kemudian dihitung dengan menggunakan persamaan:

$$\text{Titer virus (pfu/ml)} = \frac{\text{Jumlah plaque (pfu)}}{\text{Faktor dilusi} \times \text{Volume inokulum (ml)}}$$



Gambar 3.4. Skema cara kerja dalam penelitian

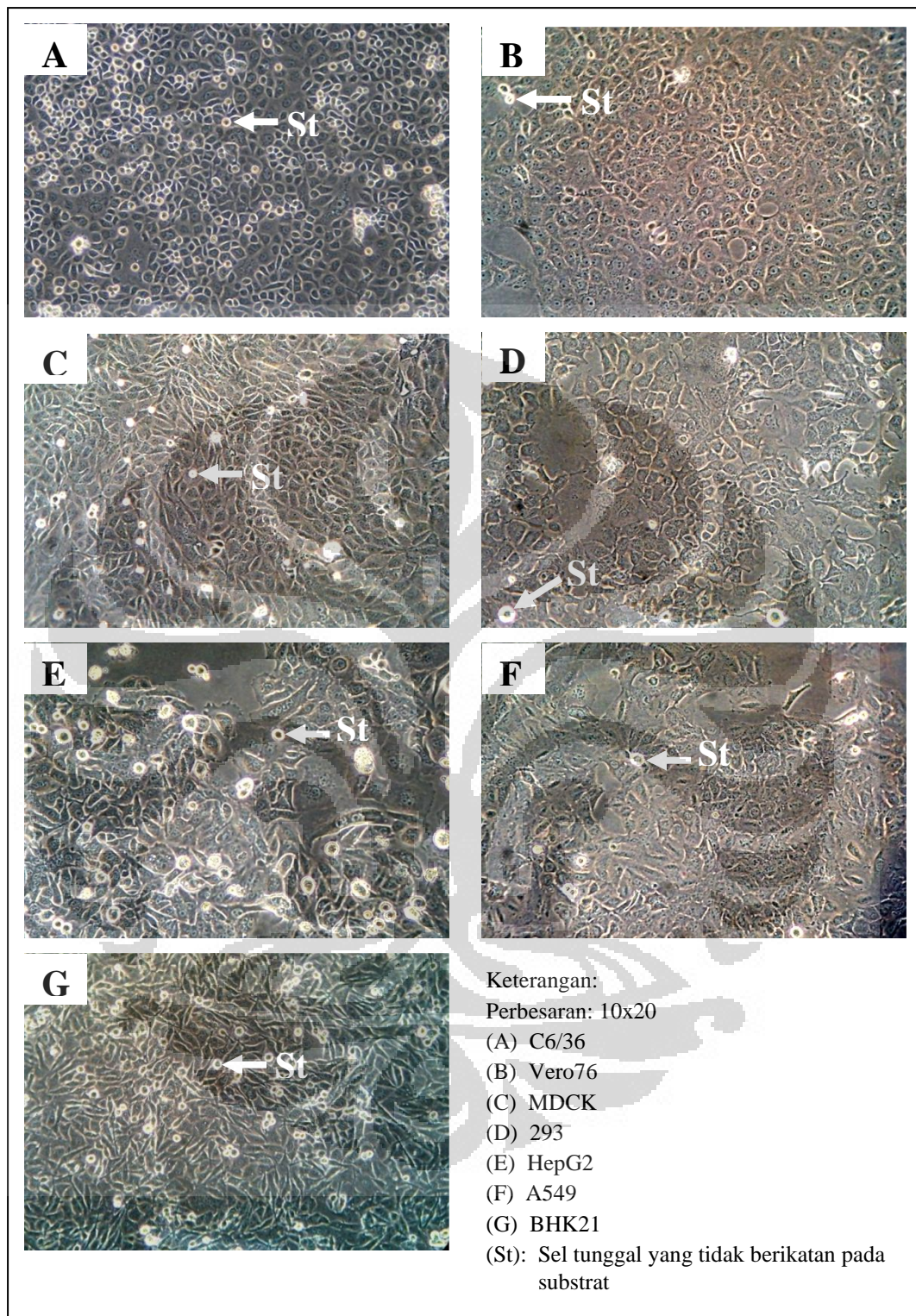
BAB 4 HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1. Analisis Kultur Sel, Propagasi Virus, dan Penghitungan Titer Virus

4.1.1. Analisis Kultur Sel

Galur sel yang digunakan dalam penelitian adalah C6/36, Vero76, MDCK, 293, HepG2, A549, dan BHK21. Hasil pengamatan tujuh galur sel kultur setelah masa inkubasi 48 jam secara mikroskopis menggunakan mikroskop fase kontras diperlihatkan pada Gambar 4.1.1. Pada gambar terlihat ketujuh sel memiliki tipe pertumbuhan yang sama, yaitu tumbuh dengan menempel pada substrat (*adherent-dependent*) sehingga membentuk monolayer. Namun, terlihat beberapa sel tunggal (St) yang berada di atas lapisan monolayer. Sel-sel tunggal tersebut merupakan sel mati yang tidak mampu berikatan pada permukaan substrat. Menurut Ryan (2008: 3&5), sel dengan tipe pertumbuhan *adherent-dependent* hanya mampu tumbuh jika berikatan langsung dengan substrat yang umumnya berupa kolagen, gelatin, fibronectin, atau laminin. Hal tersebut disebabkan penempelan pada substrat mampu meningkatkan proliferasi dan fungsi normal sel pada sel yang berasal dari hati, ginjal, epitel, dan lain-lain, sesuai dengan kondisi *in vivo* sel tersebut.

Berdasarkan hasil pengamatan, beberapa galur sel memiliki perbedaan morfologi. Galur sel Vero76, MDCK, 293, HepG2, dan A549 yang merupakan sel epitelial memiliki morfologi poligonal dan pipih (Gambar 4.1.1. B, C, D, E, dan F). Galur sel BHK21 (Gambar 4.1.1.G) yang merupakan sel fibroblas berbentuk bipolar dan memanjang. Sementara itu C6/36 (Gambar 4.1.1.A) yang berasal dari sel nyamuk berukuran lebih kecil dibandingkan galur sel lainnya yang merupakan sel mamalia. Menurut Ryan (2008: 3), tipe sel kultur berdasarkan morfologinya dibedakan menjadi *epithelial-like*, *lymphoblast-like*, dan *fibroblast-like*, yang masing-masing memiliki karakteristik morfologi berbeda.



Gambar 4.1.1. Hasil pengamatan tujuh galur sel setelah inkubasi 48 jam

Galur sel yang digunakan dalam penelitian merupakan sel koleksi laboratorium NEHCRI yang diperoleh dari *American Type Culture Collection* (ATCC). *American Type Culture Collection* merupakan salah satu bank sel atau pengkoleksi sel kultur hewan internasional terbesar (Butler 2005: 24). Alasan penggunaan galur sel adalah memiliki kecepatan pertumbuhan yang lebih tinggi dibandingkan sel primer, bersifat kontinyu, dan hanya mengandung satu jenis sel atau homogen (Mather & Roberts 1998: 5; Sinha & Kumar 2008: 64). Tujuan dari kultur sel yaitu mempersiapkan sel untuk diinfeksi dengan virus dengue pada uji kinetik.

Pemilihan jenis galur sel yang akan diinfeksi oleh virus dengue berdasarkan lokasi penemuan virus dengue secara *in vivo* pada manusia dan kemampuan galur sel diinfeksi oleh virus patogen secara *in vitro*. Dalam penelitian ini, secara *in vitro* sel hati diwakili oleh galur sel HepG2, sel paru-paru diwakili oleh A549, sel ginjal diwakili oleh 293. Sel C6/36 mewakili sel nyamuk sebagai vektor, Vero76 mewakili sel ginjal primata bukan manusia, dan MDCK mewakili sel ginjal bukan primata. Virus dengue pada manusia melalui pendekatan *immunohistochemistry* (IHC) *in vivo* ditemukan pada hati, limpa, alveolar, ginjal, dan darah (Jessie *dkk.* 2004: 1416--1417). Pengulturan sel BHK21 bertujuan mempersiapkan sel untuk *plaque assay* dalam penentuan titer virus. Hal ini ditunjang dengan karakteristik sel BHK21 yang memiliki tipe pertumbuhan monolayer dan umum digunakan dalam isolasi virus dengue (Henchal & Putnak 1990: 384; ATCC 2010: 1).

Medium yang digunakan dalam kultur galur sel adalah 1X RPMI 1640 dengan suplementasi 10% *fetal bovine serum* (FBS) dan 1% *penicillin* dan *streptomycin*. Penambahan FBS bertujuan memperkaya faktor pertumbuhan (*growth factor*) dalam medium, seperti mineral, lipid, dan hormon, sehingga mampu meningkatkan proliferasi sel dan pelekatan sel pada substrat (Freshney 2005: 120). Serum sebelum digunakan dilakukan *heat inactivation* pada suhu 56° C selama 30 menit untuk menginaktifkan komponen pada serum seperti komplemen (Barker 1998: 220). Sementara itu, tujuan penambahan 1% *penicillin* dan *streptomycin* adalah sebagai antibiotik untuk mencegah kontaminasi bakteri dan fungi (Freshney 2005: 123).

Galur sel dalam stok beku dicairkan melalui proses pencairan cepat (*rapid thawing*) untuk meminimalkan sel yang mati karena perubahan suhu yang drastis (Freshney 2005: 329). Galur sel C6/36 diinkubasi pada suhu 28° C karena sel serangga tumbuh optimal pada kisaran suhu 20--28° C yang merupakan kisaran suhu tubuh serangga dan tidak memerlukan aliran CO₂ (Freshney 2005: 484). Galur sel mamalia diinkubasi pada suhu 37° C yang merupakan suhu tubuh rata-rata mamalia sehingga diharapkan sel dapat tumbuh optimal. Pertumbuhan galur sel mamalia memerlukan aliran CO₂ sebagai *buffer* untuk menjaga keseimbangan pH. Hal tersebut berdasarkan reaksi antara CO₂ dan H₂O yang membentuk senyawa penyangga bikarbonat (HCO₃⁻), dengan reaksi sebagai berikut: H₂O + CO₂ ⇌ H₂CO₃ ⇌ H⁺ + HCO₃⁻ (Mather & Roberts 1998: 25 & 30).

Sel disubkultur secara periodik jika telah memenuhi permukaan *flask*. Tujuan dari subkultur adalah untuk menyediakan nutrisi segar dan ruang untuk sel tumbuh, sehingga viabilitas sel tetap terjaga (Mather dan Roberts 1998: 32). Sel kultur dapat dibuat stok bekunya kembali dengan menggunakan krioprotektan. Krioprotektan yang digunakan yaitu dimetil sulfoksida (DMSO) yang berperan untuk menjaga sel dari kerusakan akibat perubahan suhu dan perubahan osmotik saat pembekuan dan pencairan. Dimetil sulfoksida diketahui memiliki kemampuan penetrasi pada sel yang lebih baik dibandingkan krioprotektan lainnya, seperti gliserol. Konsentrasi DMSO yang umum digunakan adalah 7,5% dan 10% (Butler 1998: 50; Freshney 2005: 322).

Tabung kriogenik disimpan dalam kotak polistiren yang berisi isopropanol pada suhu -80° C untuk memperoleh laju penurunan suhu 1° C/menit sehingga mencegah perubahan suhu yang drastis pada proses pembekuan. Sel beku kemudian disimpan dalam nitrogen cair (-196° C) untuk menjaga kestabilan sel (Butler 1998: 50; Freshney 2005: 324).

4.1.2. Analisis Propagasi Virus Dengue pada Galur Sel C6/36

Propagasi dalam penelitian dilakukan untuk mencukupi jumlah virus yang dibutuhkan untuk diinfeksi pada sel. Propagasi virus dengue dilakukan pada

sel C6/36 karena sel tersebut memiliki sensitivitas yang lebih tinggi terhadap virus dengue dibandingkan galur sel nyamuk dan mamalia lainnya (White 1987: 1221).

Infeksi virus dilakukan dengan cara diinkubasi selama satu jam. Hal tersebut bertujuan untuk memberi kesempatan virus menginfeksi sel. Periode penempelan virus (*attachment*) pada sel inang adalah sekitar 20 menit (Voyles 2002: 22). Setelah satu jam, suspensi virus dengue dibuang yang bertujuan untuk mengangkat atau menghilangkan virus ekstraseluler yang tidak menginfeksi sel inang, sehingga hanya virus intraseluler yang tertinggal. Inkubasi dilakukan selama 7 hari atau hingga terdeteksi *cytophatic effect* (CPE). Pemanenan dilakukan selama 7 hari untuk memperoleh titer virus yang tinggi karena jumlah virus ekstraseluler mulai meningkat setelah 10 jam pasca infeksi (Butler 2005: 241) titer.

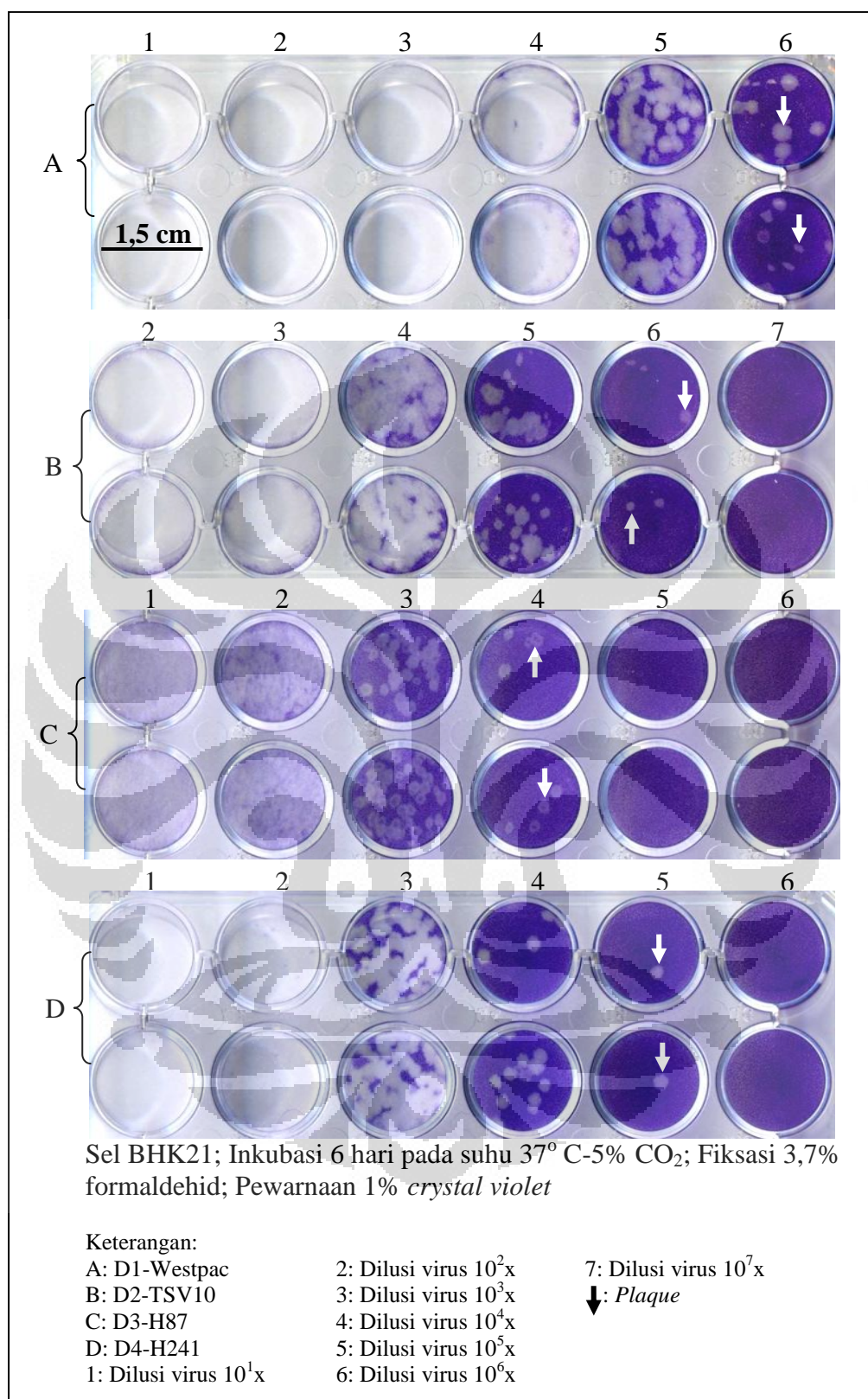
Pemanenan virus dilakukan dengan cara mengambil medium pada *flask* yang berisi sel yang terinfeksi untuk disentrifugasi. Hal tersebut dilakukan karena medium tersebut mengandung virus ekstraseluler sebagai hasil dari replikasi virus intraseluler yang akhirnya melisis sel inang, sehingga virus terlepas ke medium (Voyles 2002: 23). Sel akan mengendap sebagai pelet, sedangkan virus yang memiliki berat yang lebih ringan dibandingkan dengan sel akan tetap berada pada medium sebagai supernatan virus. Supernatan virus kemudian dipindahkan ke tabung kriopreservasi dan diberi label. Tabung tersebut kemudian disimpan pada suhu -80°C yang bertujuan untuk menjaga kestabilan virus. Titer virus dengue hasil propagasi diukur melalui *plaque assay* (Butler 2005: 239).

4.1.3. Analisis pengukuran titer virus dengue dengan *plaque assay*

Pengukuran titer virus dengue bertujuan untuk mengetahui jumlah virus infeksius dalam sampel serum pasien atau virus hasil propagasi. Menurut Vaughn *dkk.* (2000: 8), pengukuran titer virus dengue bermanfaat untuk mengetahui tingkat keparahan infeksi virus dengue karena terdapat korelasi positif antara peningkatan titer virus dengue dalam serum pasien dengan tingkat keparahan infeksi virus dengue.

Hasil pengukuran titer virus dengue hasil propagasi D1-Westpac-P4, D2-TSV01, D3-H87, dan D4-H241 secara berurutan, yaitu $5,167 \times 10^7$ pfu/ml, $1,167 \times 10^7$ pfu/ml, $2,33 \times 10^5$ pfu/ml, dan 5×10^5 pfu/ml (Gambar 4.1.3. A, B, C, dan D). Perhitungan *plaque assay* dapat dilihat pada Lampiran 5. *Plaque forming unit* (pfu) didefinisikan sebagai *plaque* yang terbentuk akibat infeksi virus tunggal pada sel inang (Butler 2005: 239; Matrosovich *dkk.* 2006: 2). *Plaque* dideteksi dengan menggunakan pewarna seluler *crystal violet* 1% yang diteteskan pada sel monolayer. *Plaque* terlihat suatu area atau zona yang berisi sel yang mati atau hancur akibat infeksi virus, yang tidak mampu terwarnai oleh *crystal violet* sehingga terlihat sebagai zona bening. Sementara itu sel yang hidup akan terwarnai ungu oleh *crystal violet* (Matrosovich *dkk.* 2006: 2). *Plaque* yang terbentuk kemudian dihitung dan dikonversi menggunakan rumus tertentu (Mahy & Kangro 1996: 38).

Pemilihan metode *plaque assay* dalam pengukuran titer virus dengue adalah karena *plaque assay* merupakan metode yang paling umum dan standar digunakan untuk menguantifikasi virus infeksius, khususnya virus dengue (Matrosovich *dkk.* 2006: 2). Metode *plaque assay* memiliki sensitivitas yang tinggi karena dapat mendeteksi titer virus yang rendah, yaitu di bawah 10^4 pfu/ml, meskipun membutuhkan waktu 5 hingga 7 hari. Selain itu, metode *plaque assay* lebih sederhana dan membutuhkan biaya yang lebih rendah dibandingkan metode pengukuran titer virus lainnya, seperti FACS (Lambeth *dkk.* 2005: 3271 & 3267). Sel yang digunakan dalam *plaque assay* adalah sel BHK21 karena pertumbuhannya bersifat *anchorage-dependent* atau sel yang tumbuh jika berikatan dengan substrat sehingga membentuk monolayer sel dan virus dapat membentuk *plaque*. Hanya sel dengan kepadatan 80--100% setelah masa inkubasi 24 jam yang akan diinfeksi. Hal tersebut bertujuan agar *plaque* yang terbentuk dapat terlihat dengan jelas pada sel monolayer karena ruang antar sel yang terlalu besar merupakan salah satu faktor yang menyebabkan *plaque* yang terbentuk kurang baik (Butler 2005: 239).



Gambar 4.1.3. Hasil *plaque assay* D1-Westpac, D2-TSV10, D3-H87 dan D4-H241

Pembuatan dilusi berseri terhadap stok virus dalam *plaque assay* bertujuan agar *plaque* tidak menumpuk dan dapat dibedakan dengan jelas dan memudahkan penghitungan jumlah *plaque*. Sementara itu, penggunaan medium *overlay* yang kental bertujuan untuk membatasi penyebaran dan pertumbuhan virus, sehingga virus hanya menginfeksi sel disekitar sel awal yang terinfeksi. Inkubasi *plate* dalam 3,7% *formaldehyde* selama 30 menit dilakukan untuk mencuci medium *overlay* dan memfiksasi sel agar tetap melekat pada *plate* (Herzog dkk. 2008: 2).

4.2. Analisis Hasil Uji Kinetik Empat Serotipe Virus Dengue pada Enam Galur Sel

4.2.1. Analisis Variabel Uji Kinetik

Uji kinetik dilakukan untuk mengetahui profil kecepatan replikasi virus dengue dalam sel inang. Variabel terikat dalam uji kinetik yaitu profil pertumbuhan tiap serotipe virus dengue pada enam galur sel. Variabel bebas dalam uji kinetik yang dilakukan yaitu serotipe virus dengue (DEN1-4) dan jenis galur sel (C6/36, Vero76, MDCK, 293, HepG2, A549) (Lampiran 12). Kontrol positif sekaligus sebagai *outgroup* dalam uji kinetik yang dilakukan yaitu profil pertumbuhan tiap serotipe virus dengue pada galur sel C6/36. Sementara itu sebagai kontrol negatif yaitu sel C6/36 yang tidak diinfeksi. Sel C6/36 merupakan galur sel nyamuk dan memiliki sensitivitas yang lebih tinggi terhadap virus dengue dibandingkan galur sel nyamuk dan mamalia lainnya (White 1987: 1221).

Variabel tetap dalam uji kinetik yang dilakukan yaitu jumlah sel yang akan diinfeksi, jumlah partikel virus yang menginfeksi, titik waktu penyamplingan, dan medium yang digunakan. Tiap galur sel ditumbuhkan dengan jumlah yang sama, yaitu sekitar 5×10^5 sel per *well*. Sementara itu, tiap serotipe virus dengue diinfeksi dengan jumlah yang sama, yaitu 0,01 *multiplicity of infection* (moi). Nilai moi menunjukkan perbandingan antara jumlah virus yang menginfeksi dan jumlah sel yang akan diinfeksi. Oleh karena itu, nilai moi akan memengaruhi kecepatan replikasi virus. Nilai moi yang terlalu tinggi akan menghambat

replikasi virus itu sendiri, akibat dari banyaknya sel abortif dan partikel virus defektif (Wagner *dkk.* 2008 : 167). Perhitungan jumlah sel yang akan diinfeksi dan moi virus hasil propagasi yang telah diketahui titernya dapat dilihat pada Lampiran 6 dan 7.

Penyamplangan atau pemanenan virus dilakukan pada selang waktu 12 jam selama 3 hari, sehingga terdapat 6 titik waktu yaitu 12, 24, 36, 48, 60, dan 72 jam. Pemilihan titik waktu tersebut disebabkan virus umumnya akan dilepaskan dari sel inang dalam waktu sekitar 10 jam pasca infeksi (Butler 2005: 241). Selain itu, menurut Libraty *dkk.* (2002: 1167) protein NS1 ekstraseluler dapat terdeteksi dalam waktu 72 jam dari awal infeksi. Medium yang digunakan untuk menumbuhkan keenam galur sel yaitu RPMI 1640. Medium RPMI merupakan medium yang banyak digunakan dan cocok untuk segala jenis sel (Freshney 2005: 126).

Penginfeksian virus dilakukan setelah sel yang ditanam pada *well* dan diinkubasi semalaman, sekitar 16 jam, untuk memberi kesempatan sel tumbuh dan melekat pada dasar *flask*. Sel hewan umumnya memiliki "*doubling time*" sekitar 15--25 jam selama fase eksponensial (Butler 2005: 58). Saat tahap penginfeksian virus dilakukan inkubasi selama 1 jam agar virus berkesempatan menginfeksi sel. Periode penempelan virus (*attachment*) pada sel inang adalah sekitar 20 menit (Voyles 2002: 22). Setelah satu jam, suspensi virus dibuang dan sel dicuci satu kali menggunakan PBS untuk mengangkat atau menghilangkan virus ekstraseluler yang tidak menginfeksi sel inang, sehingga hanya virus intraseluler yang tertinggal. Dengan demikian, profil pertumbuhan yang dihasilkan murni dari virus intraseluler.

Penyamplangan dilakukan dengan mengambil supernatan virus pada tiap titik waktu. Virus yang menginfeksi sel akan bereplikasi dan melisis sel, sehingga progeni virus terlepas pada medium atau ekstraseluler (Butler 2005: 240). Tiap sampel supernatan virus kemudian diukur titernya dengan metode *plaque assay*.

4.2.2. Analisis Profil Pertumbuhan dan Statistik Empat Serotipe Virus Dengue

Hasil uji kinetik disajikan dalam bentuk grafik atau profil pertumbuhan yang memperlihatkan hubungan antara titer virus (pfu/ml) dan titik waktu (jam). Data tabel dapat dilihat pada Lampiran 13--16. Berdasarkan hasil uji kinetik D1-Westpac (Gambar 4.2.2(1) A), terlihat pertumbuhan D1 pada C6/36 sebagai kontrol positif memiliki profil pertumbuhan yang lebih rendah dibandingkan pada galur sel mamalia Vero76, A549, dan 293. Namun, pertumbuhan D1 pada C6/36 memiliki profil pertumbuhan yang relatif lebih tinggi dibandingkan pada galur sel mamalia HepG2 dan MDCK. Pertumbuhan D1 pada galur sel Vero76 dan A549 memiliki profil pertumbuhan yang relatif sama dan relatif lebih tinggi dibandingkan pada galur sel mamalia lainnya. Oleh karena itu, secara umum diketahui D1-Westpac memiliki kecepatan replikasi tertinggi hingga terendah pada galur sel mamalia secara berurutan, yaitu Vero76>A549>293>HepG2>MDCK.

Berdasarkan hasil uji kinetik D2-TSV01 (Gambar 4.2.2(1) B), terlihat bahwa profil pertumbuhan D2 tertinggi terjadi pada C6/36 sebagai kontrol positif. Namun, pertumbuhan D2 tertinggi pada galur sel mamalia terjadi pada A549, diikuti Vero76 dan 293. Profil pertumbuhan D2 pada A549 relatif sama pada Vero76. Pada grafik dapat terlihat bahwa galur sel HepG2 dan MDCK tidak mampu mendukung pertumbuhan virus hingga 72 jam. Oleh karena itu, secara umum diketahui D2-TSV01 memiliki kecepatan replikasi tertinggi hingga terendah pada galur sel mamalia secara berurutan, yaitu A549>Vero76 >293, dan HepG2=MDCK.

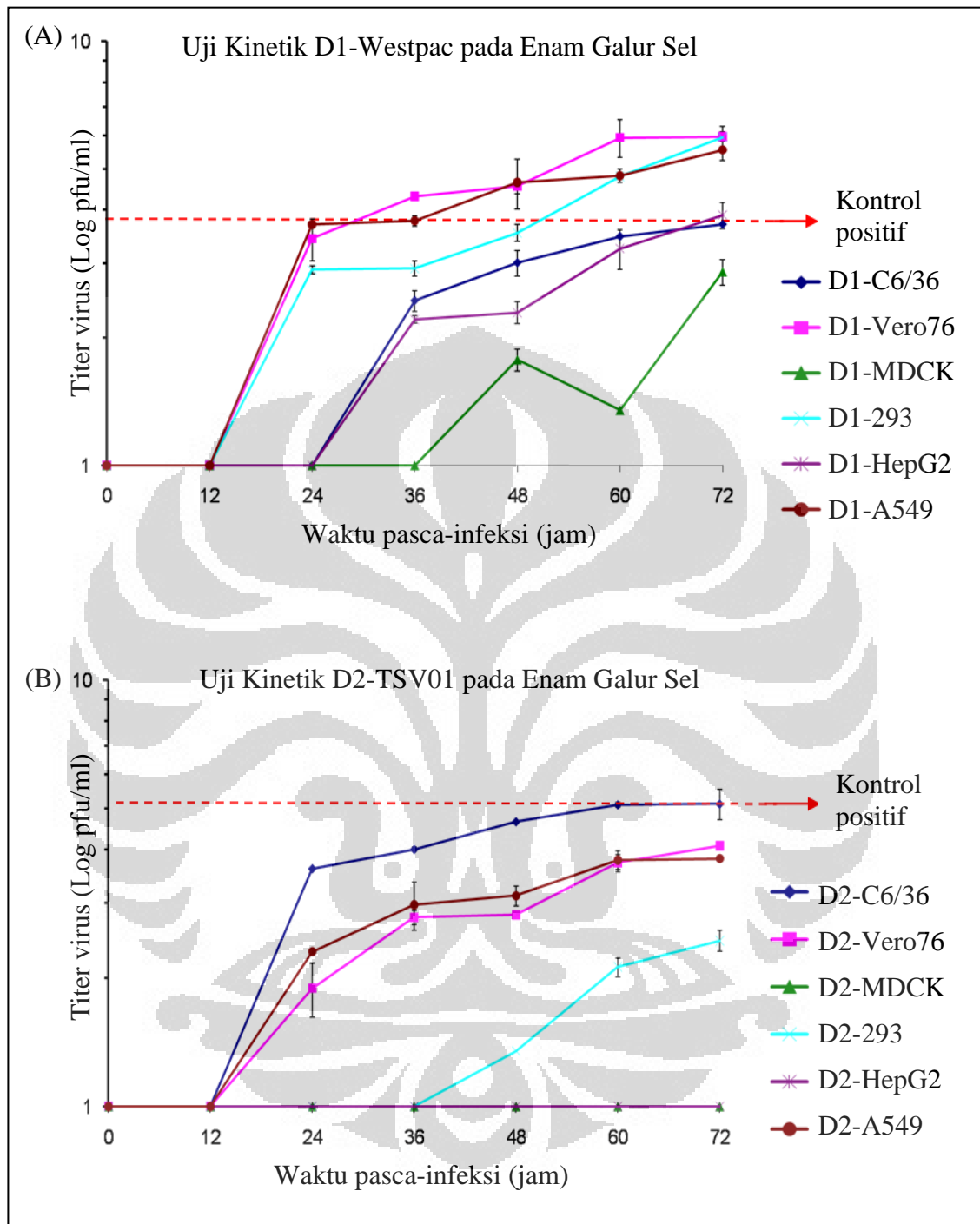
Hasil uji kinetik D3-H87 (Gambar 4.2.2(2) A) menunjukkan bahwa pertumbuhan D3 tertinggi terjadi pada galur sel mamalia A549, relatif lebih tinggi dibandingkan profil pertumbuhan D3 pada C6/36 sebagai kontrol positif. Profil pertumbuhan D3 pada galur sel Vero76, diikuti 293 dan HepG2, terlihat relatif lebih rendah dibandingkan pada C6/36. Pada grafik dapat terlihat bahwa galur sel MDCK tidak mampu mendukung pertumbuhan virus hingga 72 jam. Dengan demikian, secara umum diketahui D3-H87 memiliki kecepatan replikasi dari yang

tertinggi hingga terendah pada galur sel mamalia secara beurutan, yaitu A549>Vero76>293> HepG2>MDCK.

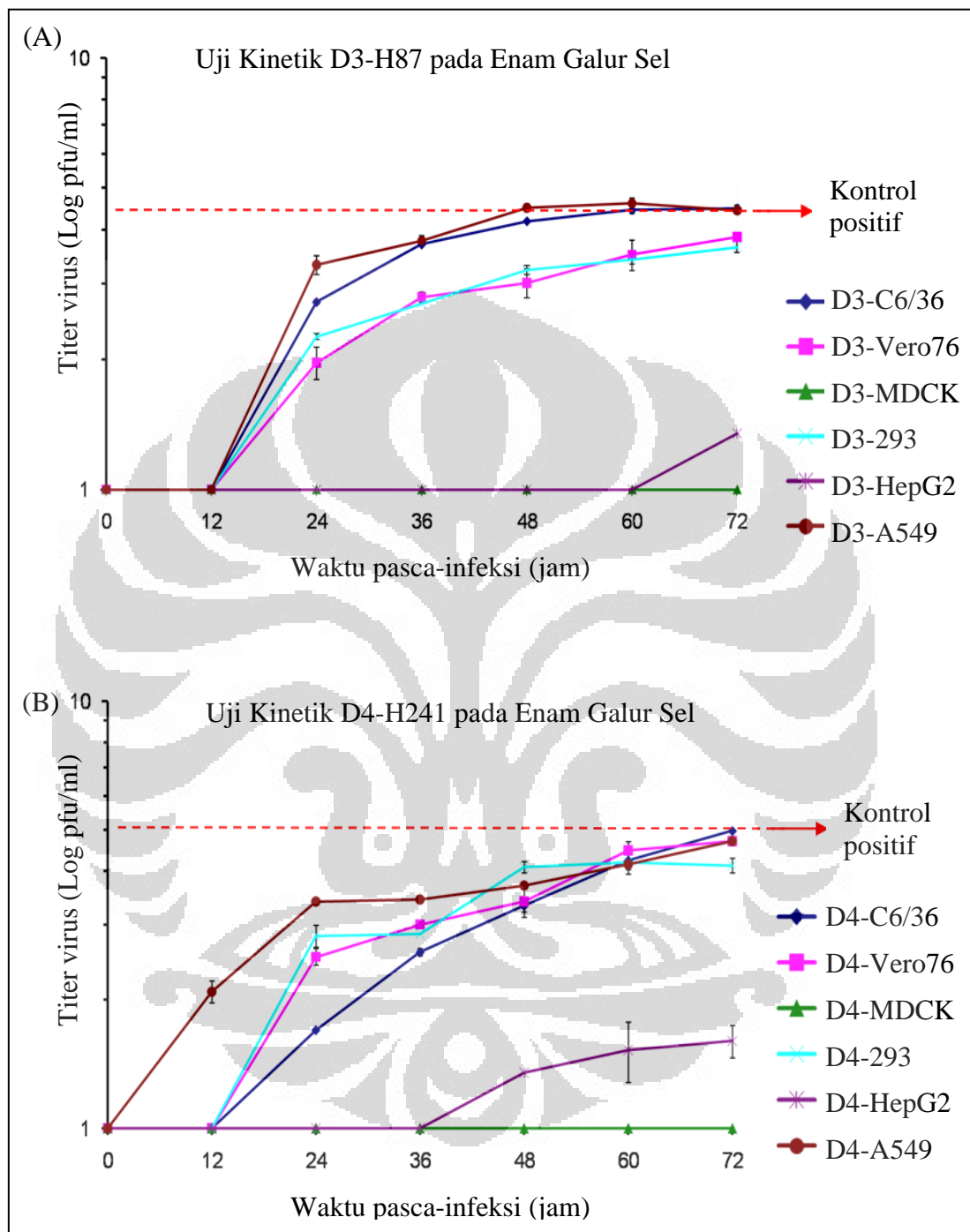
Berdasarkan hasil uji kinetik D4-H241 (Gambar 4.2.2(2) B), terlihat pertumbuhan D4 tertinggi terjadi pada galur sel mamalia A549 dan relatif lebih tinggi dibandingkan profil pertumbuhan D4 pada C6/36 sebagai kontrol positif. Pada grafik juga dapat terlihat bahwa profil pertumbuhan D4 relatif lebih tinggi pada galur sel mamalia Vero76 dan 293 dibandingkan pada C6/36. Sementara itu, pertumbuhan D4 relatif rendah pada galur sel HepG2. Pada grafik dapat terlihat bahwa galur sel MDCK tidak mampu mendukung pertumbuhan virus hingga 72 jam. Dengan demikian, secara umum diketahui D4-H241 memiliki kecepatan replikasi dari yang tertinggi hingga terendah pada galur sel mamalia secara beurutan, yaitu A549>Vero76>293>HepG2>MDCK.

Hasil uji kinetik secara umum menunjukkan bahwa pertumbuhan virus dengue tertinggi pada galur sel mamalia, yaitu pada galur sel A549. Sementara itu, virus dengue yang tidak mampu tumbuh pada beberapa galur sel, yaitu D2-HepG2, D2-MDCK, D3-MDCK, dan D4-MDCK, akan dianalisis pada pembahasan selanjutnya. Berdasarkan grafik hasil uji kinetik secara keseluruhan, terlihat profil pertumbuhan tiap serotipe virus dengue berbeda pada enam galur sel. Data kemudian diperkuat dengan uji statistik untuk melihat ada atau tidaknya perbedaan bermakna profil pertumbuhan virus dengue pada tiap kelompok galur sel. Uji statistik dilakukan menggunakan *software* SPSS versi 17 (SPSS Inc.).

Data uji kinetik dari tiap serotipe virus dengue diuji normalitas menggunakan uji Shapiro-Wilk untuk mengetahui kenormalan distribusi data secara analitik (Dahlan 2004: 55). Hasil uji normalitas dapat dilihat pada Lampiran 10. Berdasarkan uji normalitas, data profil pertumbuhan keempat serotipe dengue pada enam galur sel memiliki distribusi data yang tidak normal ($p < 0,05$). Dengan demikian, dilakukan uji non-parametrik Kruskal-Wallis untuk melihat ada atau tidaknya perbedaan bermakna pada kelompok data (Dahlan 2004: 87 & 91).



Gambar 4.2.2(1). Grafik pertumbuhan virus D1-Westpac (A) dan D2-TSV01 pada enam galur sel (B)



Gambar 4.2.2(2). Grafik pertumbuhan virus D3-H87 (A) dan D4-H241 pada enam galur sel (B)

Pemilihan uji statistik non-parametrik Kruskal-Wallis dilakukan karena tujuan dari eksperimen untuk menguji hipotesis komparatif dan data uji merupakan variabel numerik yang memiliki lebih dari dua kelompok, dalam hal ini 6 kelompok galur sel. Uji non-parametrik Kruskal-Wallis dilakukan dengan tingkat kepercayaan 95%. Hasil uji statistik dapat dilihat pada Tabel 4.2.2 dan Lampiran 11. Berdasarkan uji tersebut, diketahui bahwa terdapat perbedaan bermakna pada kelompok data ($p < 0,05$) (Dahlan 2004: 87). Dengan demikian, dapat disimpulkan bahwa terdapat perbedaan karakter pertumbuhan tiap serotipe virus dengue pada enam galur sel.

Tabel 4.2.2. Hasil uji statistik non-parametrik Kruskal-Wallis pertumbuhan empat serotipe virus dengue

Serotipe virus dengue	Nilai p	Keterangan
D1	0,001	Terdapat perbedaan profil pertumbuhan virus pada enam sel
D2	0,000	Terdapat perbedaan profil pertumbuhan virus pada enam sel
D3	0,001	Terdapat perbedaan profil pertumbuhan virus pada enam sel
D4	0,000	Terdapat perbedaan profil pertumbuhan virus pada enam sel

4.2.3. Analisis Galur Sel Vero76 dan A549 sebagai Sel Mamalia Alternatif

Berdasarkan grafik hasil uji kinetik (Gambar 4.2.2(1) dan 4.2.2(2), secara konstan terlihat empat serotipe virus dengue memiliki pertumbuhan yang relatif tinggi pada tiga galur sel, yaitu sel C6/36 sebagai kontrol positif, Vero76, dan A549. Sel C6/36 dijadikan sebagai kontrol positif karena merupakan sel yang paling sensitif untuk infeksi virus dengue, sehingga umum digunakan untuk propagasi (White 1987: 1221). Pada hasil penelitian menunjukkan profil pertumbuhan virus dengue pada galur sel mamalia Vero79 dan A549 relatif lebih tinggi dibandingkan C6/36 sebagai kontrol positif. Hal tersebut dapat mendukung penggunaan sel mamalia sebagai sel alternatif untuk propagasi dan infeksi virus

dengue. Selain itu didapatkan hasil pula bahwa pertumbuhan tertinggi virus dengue pada galur sel mamalia terjadi pada sel A549.

Sel Vero76 merupakan sel model yang umum digunakan untuk analisis pembuatan vaksin, khususnya vaksin dengue (Noisakran *dkk.* 2010: 5). Replikasi virus dengue yang tinggi dalam galur sel Vero76 dapat disebabkan karena Vero76 tidak mampu menyintesis interferon (Desmyter *dkk.* 1968: 956). Menurut De Clercq dan De Somer (1973:122), ketidakmampuan Vero menyintesis interferon dapat disebabkan oleh tidak adanya gen struktural pengkode interferon fungsional, adanya suatu molekul represor, atau gagalnya inducer berinteraksi secara efisien dengan sel. Interferon merupakan sitokin yang dihasilkan oleh sel karena induksi infeksi virus (Biron & Sen 2007: 249).

Emeny dan Morgan (1979: 251) menambahkan bahwa sel Vero mengalami kerusakan genetik pada gen pengkode interferon tipe I, yaitu interferon alfa (IFN- α) dan beta (IFN- β). Menurut Diamond dan Harris (2001: 304), IFN- α dan IFN- β merupakan penghambat replikasi tahap awal virus dengue dengan cara menghambat translasi RNA virus infeksius. Oleh karena itu, ketiadaan interferon pada sel Vero76 menyebabkan sel mudah terinfeksi sehingga replikasi virus dengue semakin tinggi.

Sementara itu, galur sel A549 dilaporkan dapat mendukung berbagai pertumbuhan virus patogen, seperti adenovirus (Uhnoo *dkk.* 1984: 367; Wadell *dkk.* 1985: 403; Smith *dkk.* 1986: 268), *herpes simplex virus* (HSV) (Smith *dkk.* 1986: 268), dan virus dengue (Diamond *dkk.* 2000: 7815; Fink *dkk.* 2007: 4). Menurut Smith *dkk.* (1986: 268), sel A549 memiliki sensitivitas lebih tinggi untuk mengisolasi adenovirus dibandingkan dengan sel HEK-293 dan CMK. Hasil yang sama juga didapatkan pada isolasi HSV. Fink *dkk.* (2007: 3) menambahkan bahwa pertumbuhan virus dengue serotipe 2 tertinggi terjadi pada sel A549 dibandingkan sel HepG2, SK-Hep-1, K562, HUV-EC-C, THP-1 dan HeLa. Dengan demikian, hasil penelitian Smith *dkk.* (1986: 268) dan Fink *dkk.* (2007: 3) mendukung hasil penelitian ini yang menunjukkan pertumbuhan virus dengue pada sel A549 lebih tinggi dibandingkan galur sel manusia HEK-293 dan HepG2.

Galur sel A549 mampu mendukung pertumbuhan berbagai virus patogen diduga karena memiliki viabilitas dan sensitivitas yang tinggi. Viabilitas sel tersebut mencapai 10 hingga 14 hari dalam kultur tanpa terjadi degradasi yang signifikan (Smith *dkk.* 1986: 267). Menurut Enemy dan Morgan (1979), salah satu keberhasilan dalam propagasi virus adalah kemampuan sel untuk diinfeksi virus berbeda yang diduga karena banyaknya reseptor dan pengambilan partikel virus non spesifik pada sel (*lihat* Enemy & Morgan 1979: 248). Dengan demikian, sel A549 dapat dijadikan sel mamalia alternatif untuk propagasi virus dengue, selain sel Vero76 yang sudah umum digunakan (Noisakran *dkk.* 2010: 5).

4.3. Ekspresi Protein NS1 pada Galur Sel Vero76 dan A549

Deteksi ekspresi protein NS1 dilakukan secara semikuantitatif menggunakan metode *sandwich* ELISA dengan kit Platelia Bio-Rad. Antibodi penangkap dan pendeteksi yang digunakan adalah monoklonal antibodi (MAb) murine yang bersifat spesifik pada antigen NS1 keempat virus dengue.

Sampel dan kontrol secara langsung diinkubasi dengan konjugat selama 90 menit pada suhu 37° C pada mikroplate yang telah dilapisi MAb. Jika terdapat antigen NS1 pada sampel, maka akan terbentuk imunokompleks MAb-NS1-MAb/peroksidase. Setelah tahap pencucian, keberadaan imunokompleks tersebut diketahui dengan penambahan kromogenik substrat (Young *dkk.* 2000: 1054). Jika terdapat imunokompleks maka akan terjadi perubahan warna substrat karena reaksi antara substrat dengan enzim. Setelah penginkubasian selama 30 menit pada suhu ruang ditambahkan larutan asam untuk menghentikan reaksi. Nilai *optical density* (OD) dibaca menggunakan ELISA *reader* pada panjang gelombang 450 nm (Alcon *dkk.* 2002: 377).

Uji ELISA dilakukan pada tiap titik waktu supernatan virus dengue dari sel Vero76 dan A549 sebagai sel mamalia alternatif untuk infeksi dan propagasi virus dengue. Hal tersebut dilakukan untuk melihat karakteristik ekspresi NS1 pada galur sel tersebut. Namun, karena adanya perbedaan titer pada keempat serotipe virus dengue baik pada sel Vero76 maupun A549, maka dilakukan dilusi

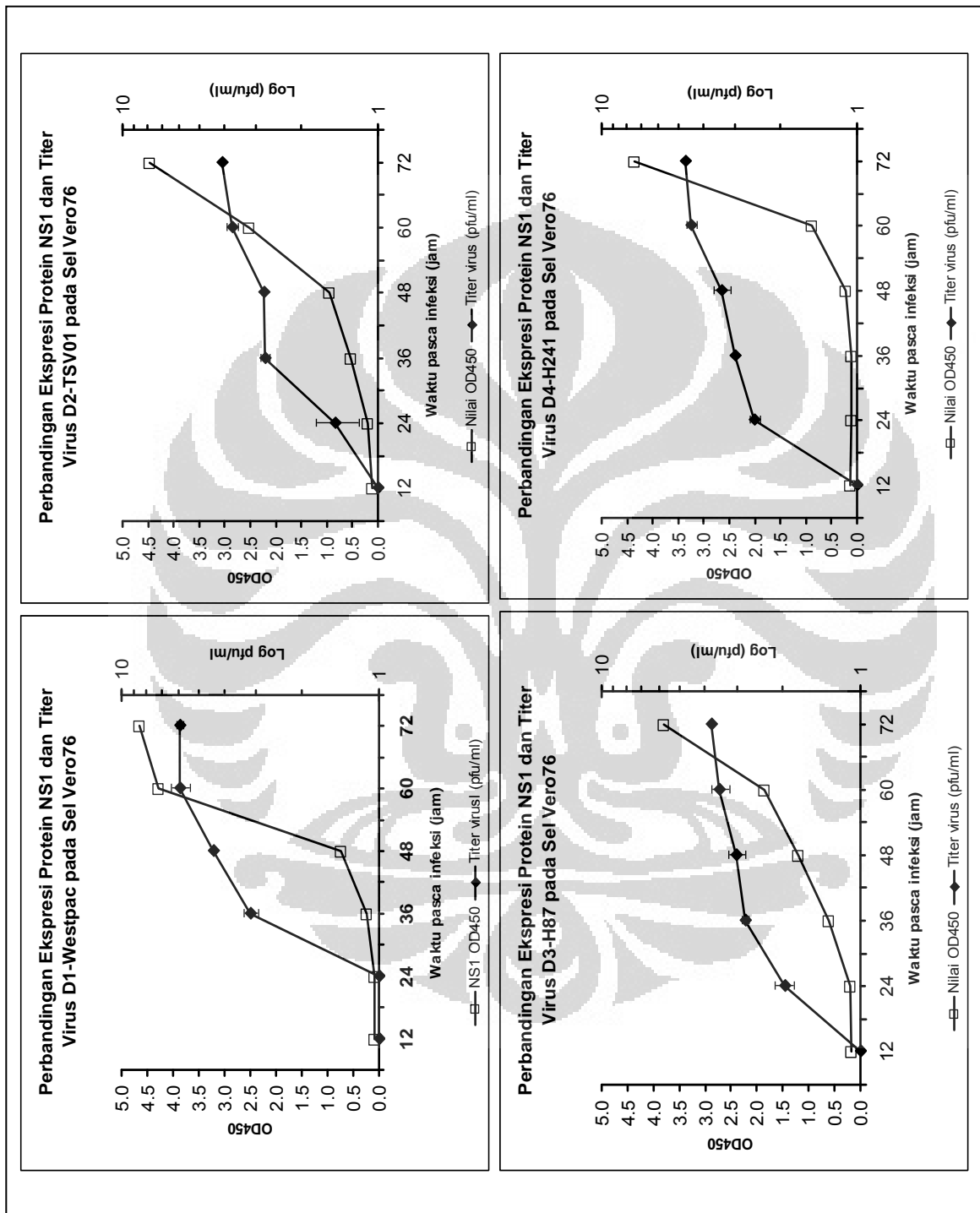
berbeda pada supernatan (Tabel 4.3). Hal tersebut bertujuan agar profil ekspresi NS1 pada titer virus yang rendah juga dapat terlihat.

Tabel 4.3. Dilusi supernatan untuk uji ELISA

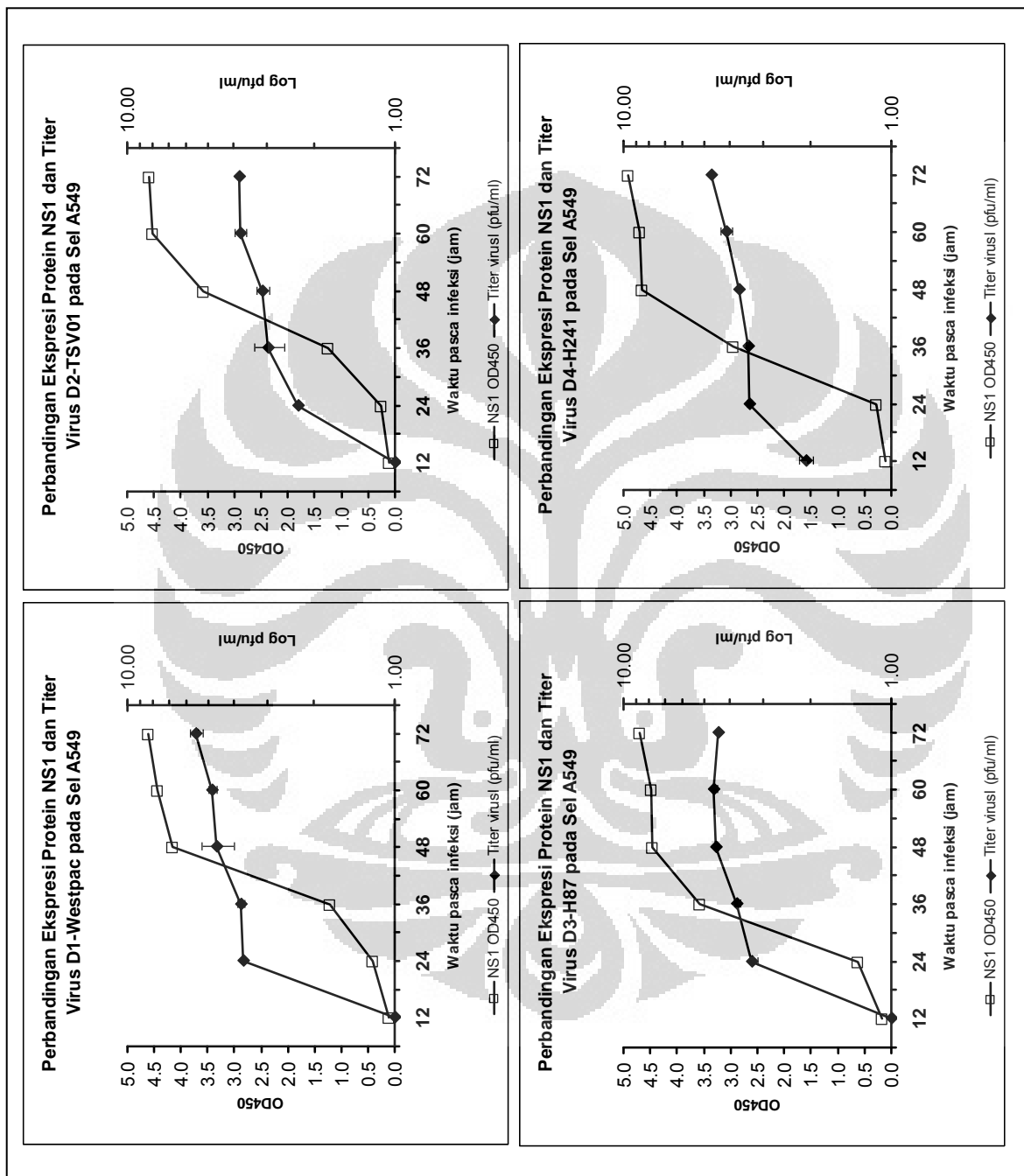
Supernatan	Dilusi
D1-Vero76	100x
D2-Vero76	10x
D3-Vero76	100x
D4-Vero76	100x
D1-A549	10x
D2-A549	Tidak didilusi
D3-A549	10x
D4-A549	10x

Berdasarkan hasil uji ELISA (Gambar 4.3(1) dan 4.3(2) baik pada sel Vero76 maupun A549 dapat dilihat terjadinya peningkatan jumlah NS1 seiring peningkatan titik waktu dan titer virus. Data tabel dapat dilihat pada Lampiran 8 dan 9. Hasil tersebut memiliki kesesuaian dengan penelitian Young *dkk.* (2000: 1055) yang menyatakan bahwa peningkatan jumlah protein NS1 ekstraseluler berbanding lurus dengan titer virus dengue pada supernatan kultur. Hasil yang sama juga ditunjukkan pada ekspresi protein NS1 pada sampel serum, sehingga NS1 dapat dijadikan sebagai penanda awal untuk infeksi virus dengue (Young *dkk.* 2000: 1056).

Peningkatan NS1 setelah 12 jam disebabkan peningkatan jumlah virus. Menurut Butler (2005: 241) pelepasan virus umumnya akan terjadi 10 jam pasca infeksi. Hasil tersebut sesuai dengan Libraty *dkk.* (2002: 1167) yang menyatakan antigen NS1 dapat dideteksi dalam waktu 72 jam dari pasca infeksi. Protein NS1 berstruktur heksamer merupakan satu-satunya protein non struktural virus dengue yang diekspresikan terikat pada membran sel dan secara ekstraseluler (Flamand *dkk.* 1999: 6104). Protein NS1 dilaporkan berperan penting dalam viabilitas virus dan berfungsi sebagai kofaktor untuk tahap awal replikasi virus dan berkorelasi dengan efisiensi replikasi (Flamand *dkk.* 1999: 6106).



Gambar 4.3(1). Grafik ekspresi protein NS1 empat serotipe virus dengue pada sel Vero76



Gambar 4.3(2) Grafik ekspresi protein NS1 empat serotipe virus dengue pada sel A549

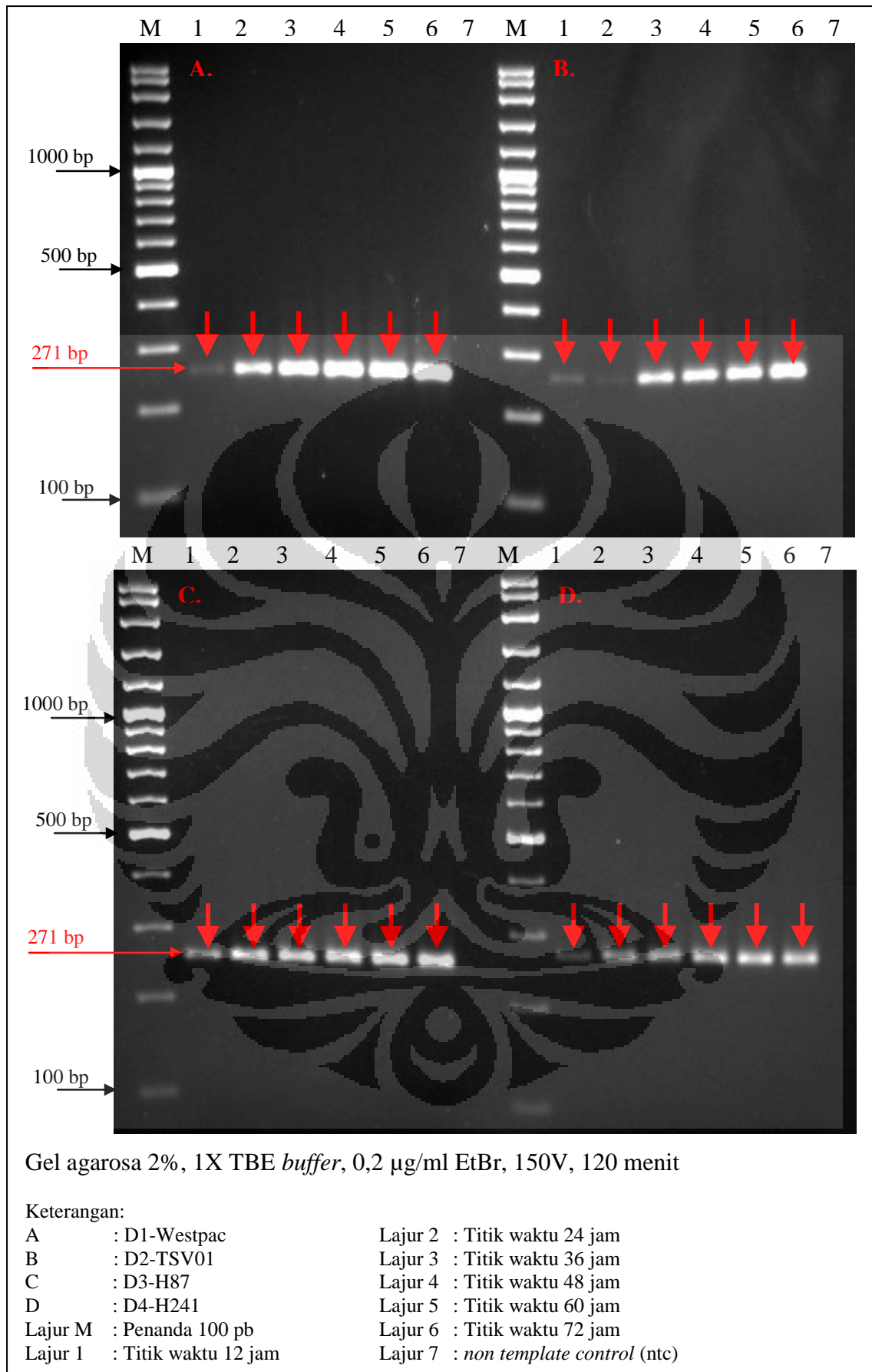
4.4. Analisis Deteksi Genom Virus Dengue pada Sel Vero76 dan A549

Berdasarkan hasil uji kinetik keempat serotipe virus dengue, diketahui bahwa sel Vero76 dan sel A549 dapat dijadikan sel mamalia alternatif propagasi virus dengue. Genom virus dengue dari supernatan virus hasil uji kinetik tiap titik waktu diverifikasi menggunakan RT-PCR. Tahapan-tahapan yang dilakukan, yaitu ekstraksi RNA, RT-PCR, dan elektroforesis. Sampel dideteksi positif terinfeksi virus dengue bila terdapat fragmen berukuran spesifik, yaitu 271 bp, yang teramati dengan visualisasi gel menggunakan sinar ultraviolet (Gambar 4.4(1) dan 4.4(2)).

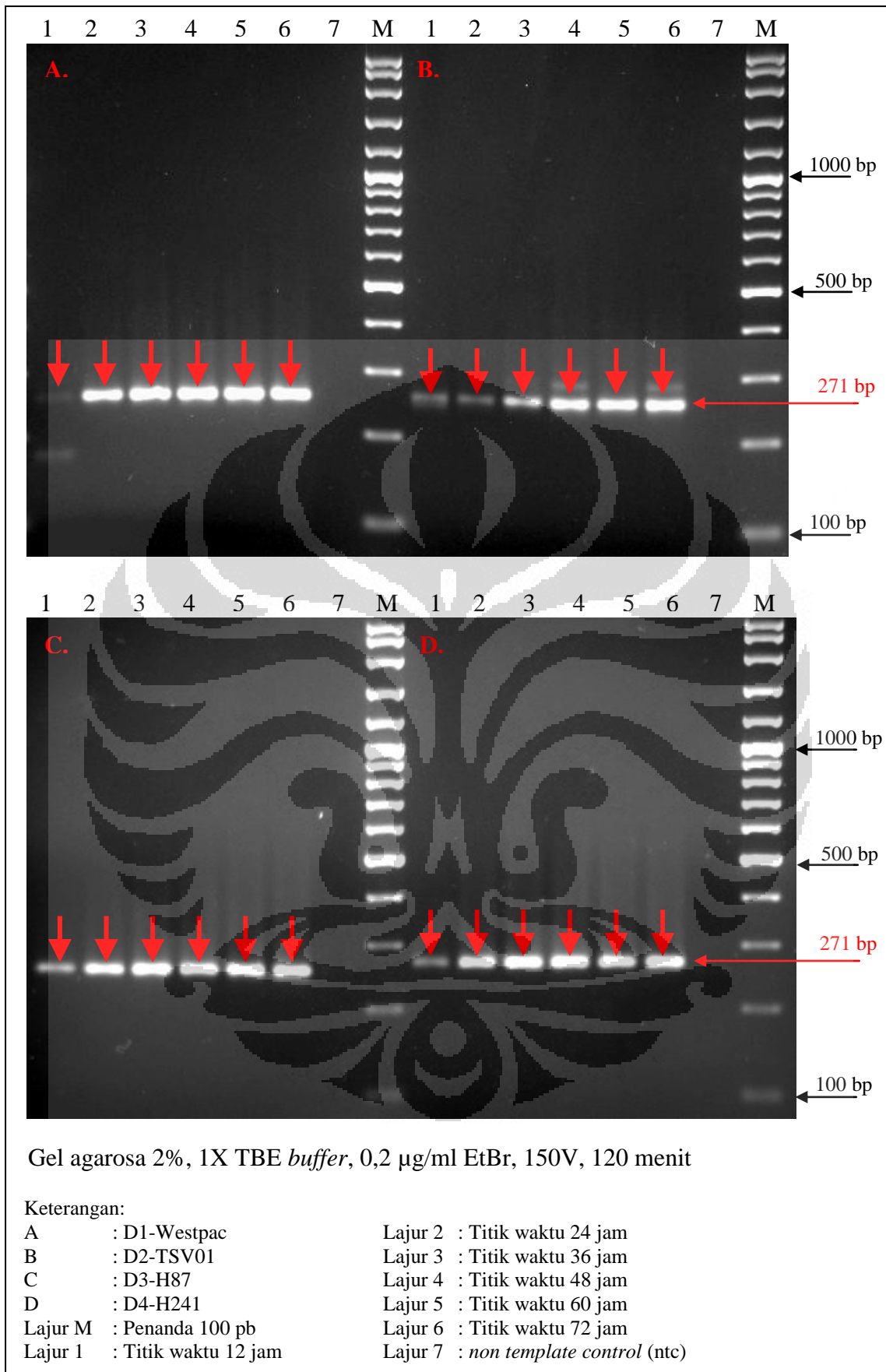
Ketebalan pita yang relatif meningkat dari titik waktu 12 jam hingga 72 jam yang menunjukkan terjadi peningkatan keberadaan RNA genom yang menandakan adanya pertumbuhan virus dengue pada galur sel yang terinfeksi. Menurut Lanciotti *dkk.* (1992:546) genom virus dengue mampu dideteksi secara semikuantitatif menggunakan RT-PCR. Peningkatan jumlah RNA genom virus dapat dijadikan penanda pertumbuhan virus dengue yang akan meningkat seiring peningkatan titer virus (Rico-Hesse 2009: 2). Menurut Butler (2005: 241) pelepasan virus umumnya akan terjadi 10 jam pasca infeksi, sehingga peningkatan titer virus akan terlihat secara periodik tiap 10 jam.

Berdasarkan Lanciotti *dkk.* (1992:546), proses pendeteksian virus dengue dengan RT-PCR dilakukan melalui dua tahap utama, yaitu reaksi *reverse transcriptase* kemudian dilanjutkan dengan PCR. Reaksi *reverse transcriptase* bertujuan untuk menyalin RNA menjadi *complementary DNA* (cDNA), sedangkan PCR bertujuan untuk mengamplifikasi cDNA hingga konsentrasi yang dapat dideteksi (Sambrook & Russel 2001b: 8.48).

Menurut Lai *dkk.* (2007: 936), penggunaan primer pan-dengue *forward* dan pan-dengue *reverse* disebabkan primer tersebut memiliki tingkat homologi tertinggi terhadap empat serotipe virus, memiliki *melting temperature* yang tinggi, dan tidak bersifat homolog dengan region genom lainnya pada virus dengue. Posisi penempelan primer pan-dengue *forward* pada genom virus dengue



Gambar 4.4(1). Hasil amplifikasi RNA virus dengue hasil uji kinetik pada sel Vero76



Gambar 4.4(2). Hasil amplifikasi RNA virus dengue hasil uji kinetik pada sel A549

adalah pada basa 10418--10444 dengan sekuens 5'-TTGCACCAACAGTCAATG TCTT CAGGTTC-3, sedangkan primer pan-dengue *reverse* pada basa 10664--10688 dengan sekuens 5'-TCAATATGCTGAAACGCGCGAGAAACCG-3'. Dengan demikian, fragmen hasil amplifikasi akan memiliki panjang 271 bp. Panjang fragmen tersebutlah yang menjadi parameter pendeteksian virus dengue.

Reaksi *reverse-transcriptase* dilakukan menggunakan enzim *Superscript III RT* yang akan menyalin RNA menjadi cDNA (Fairbanks & Andersen 1999: 277; Sambrook & Russel 2001b: 8.5). *Superscript III RT* merupakan enzim *reverse transcriptase* yang berasal dari *Moloney Murine Leukemia Virus* (M-MLV) dan berfungsi untuk mereduksi RNase H serta menjaga kestabilan suhu (Invitrogen 2003: 1). Aktivitas RNase A, B, dan C dihambat menggunakan RNaseOUT yang merupakan inhibitor ribonuklease (Invitrogen 2001: 1). Sementara itu, polimerisasi dilakukan menggunakan enzim HotStar *Taq DNA polymerase* yang merupakan enzim yang mampu meminimalisasi terbentuknya band tidak spesifik dan primer dimer sehingga lebih efisien digunakan (QIAGEN 2010: 10).

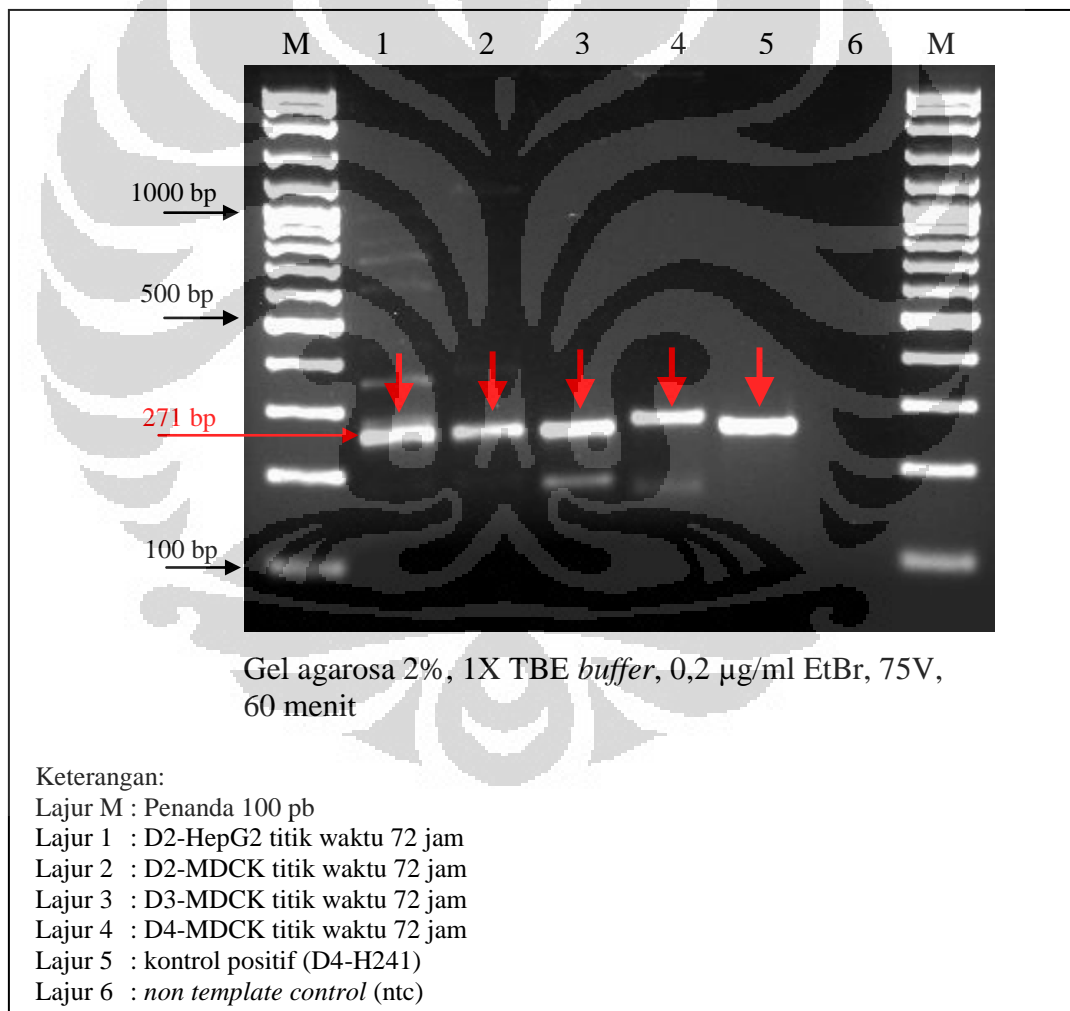
Hasil amplifikasi dari PCR diperiksa dengan elektroforesis pada gel agarosa yang mengandung etidium bromida dan *molecular weight-marker* atau marka untuk menentukan panjang fragmen DNA yang terbentuk. Marka yang digunakan memiliki panjang fragmen 100--1000 bp karena fragmen hasil amplifikasi virus dengue yang akan diamati berkisar dalam rentang tersebut. Hasil amplifikasi yang telah dielektroforesis akan dilihat dibawah sinar ultraviolet (Taylor 1993: 9). Konsentrasi gel agarosa yang digunakan ialah sebesar 2%. Hal tersebut dikarenakan ukuran fragmen yang akan diamati berkisar antara 122 dan 885 pb (Sambrook & Russel 2001a: 5.12). Hasil elektroforesis divisualisasi dan didokumentasikan dengan *gel doc* dan program *Quantity One*.

Proses deteksi virus dengue dilakukan menggunakan kontrol negatif dan kontrol positif. Kontrol negatif terdiri atas campuran komponen reaksi yang sama, tetapi RNA diganti dengan *nuclease free water*. Kontrol positif terdiri atas campuran komponen reaksi yang sama dan RNA dari sampel yang telah teridentifikasi positif mengandung virus dengue. Penggunaan kontrol dilakukan

untuk memeriksa tahapan proses yang dilakukan dan kemungkinan terjadi kontaminasi (Yuwono 2006: 23).

4.5. Analisis Hasil Uji Kinetik Konfirmasi pada Sel HepG2 dan MDCK

Berdasarkan profil pertumbuhan kinetik (Gambar 4.2.2(1) dan 4.2.2(2)), terlihat beberapa virus yang tidak menunjukkan adanya pertumbuhan, yaitu D2-HepG2, D2-MDCK, D3-MDCK, dan D4-MDCK. Oleh karena itu, dilakukan konfirmasi pada keempat supernatan virus tersebut menggunakan RT-PCR untuk mendeteksi keberadaan virus dengue (Gambar 4.2.2(3)).



Gambar 4.5. Hasil amplifikasi RNA virus dengue hasil uji kinetik pada supernatan virus yang tidak menunjukkan pertumbuhan

Hasil RT-PCR menunjukkan hasil positif pada keempat sampel yang menandakan virus dengue memang terdapat dalam supernatan sampel tetapi belum mampu membentuk *plaque*. Konfirmasi selanjutnya dilakukan dengan menginfeksi sel HepG2 dan MDCK dengan serotipe virus dengue lokal dan referensi lainnya. Penginfeksian tersebut bertujuan untuk mengetahui suseptibilitas dari sel HepG2 dan MDCK terhadap infeksi virus dengue.

Virus lokal yang digunakan adalah virus yang berasal dari Makasar, yaitu D2-0502, D3-0388, dan D4-31586. Sementara itu virus dengue referensi lain yang digunakan, yaitu D2-NGC, D3-22366, dan D4-31586. Virus lokal dan referensi diinfeksi pada sel HepG2 dan MDCK dengan prosedur yang sama dengan uji kinetik sebelumnya. Namun, penyamplangan hanya dilakukan pada titik waktu tertinggi, yaitu 72 jam.

Berdasarkan hasil penghitungan titer virus (Tabel 4.5), menunjukkan tidak adanya pertumbuhan semua virus dengue baik lokal maupun referensi pada sel MDCK. Pada sel HepG2 hanya terlihat pertumbuhan virus dengue referensi D2-NGC, sedangkan virus dengue lokal D2-0502 tidak menunjukkan adanya pertumbuhan. Dengan demikian dapat diketahui bahwa tidak semua virus dengue dapat menginfeksi (*strain-dependent*) sel HepG2, sehingga sel HepG2 diduga kurang tepat digunakan sebagai sel model dalam infeksi virus dengue.

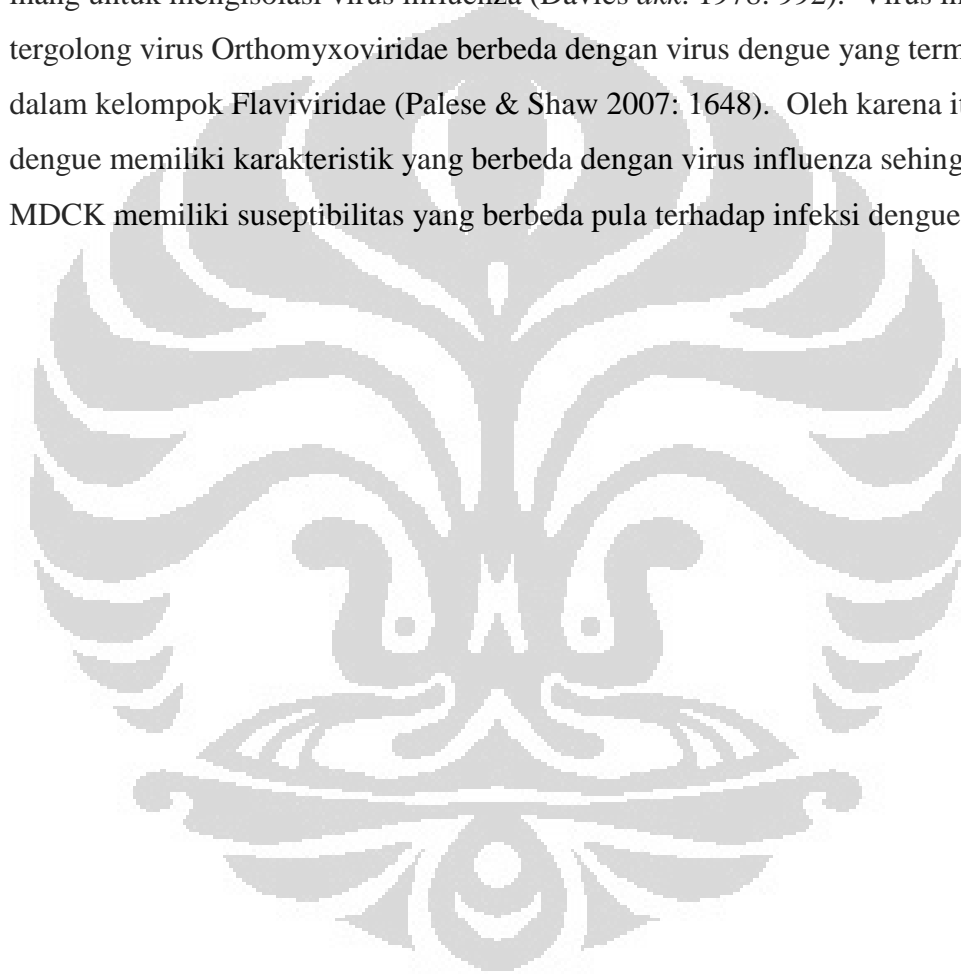
Tabel 4.5. Hasil uji kinetik konfirmasi pada sel HepG2 dan MDCK

	MDCK	HepG2
D2-0502	-	-
D2-NGC	-	1500 pfu/ml
D3-0388	-	
D3-22366	-	
D4-0252	-	
D4-31586	-	

Menurut Diamond *dkk.* (2000: 7821) infeksi virus dengue secara *in vitro* dimodulasi oleh tipe sel dan strain virus karena terkait dengan perbedaan jalur infeksi seluler. Umareddy *dkk.* (2008: 3058) melaporkan replikasi virus D2-NGC pada sel HepG2 lebih tinggi dibandingkan dengan D2-TSV01. Hal tersebut terkait dengan kemampuan D2-NGC untuk menekan ekspresi gen penstimulus

IFN yang berperan dalam aktivitas antiviral, seperti IRF9, MX1, OAS1/2/3, EIF2AK2, ISG20, G1P2/3, IFI35/44, IFIT1 dan IFITM1.

Sementara itu, sel MDCK memiliki suseptibilitas yang rendah terhadap infeksi virus dengue. Hal tersebut didukung oleh data uji kinetik pada D1-Westpac yang menunjukkan pertumbuhan virus terendah pada sel MDCK. Hasil studi literatur menunjukkan bahwa sel MDCK memang tidak umum digunakan untuk infeksi virus dengue *in vitro*. Sel MDCK umum digunakan sebagai sel inang untuk mengisolasi virus influenza (Davies *dkk.* 1978: 992). Virus influenza tergolong virus Orthomyxoviridae berbeda dengan virus dengue yang termasuk dalam kelompok Flaviviridae (Palese & Shaw 2007: 1648). Oleh karena itu, virus dengue memiliki karakteristik yang berbeda dengan virus influenza sehingga sel MDCK memiliki suseptibilitas yang berbeda pula terhadap infeksi dengue.



BAB 5

KESIMPULAN DAN SARAN

5.1. Kesimpulan

1. Karakter pertumbuhan empat serotipe virus dengue berbeda pada tiap galur sel.
2. Profil pertumbuhan empat serotipe virus dengue pada galur sel A549 relatif sama dengan galur sel Vero76 dan lebih tinggi dibandingkan dengan galur sel lainnya.
3. Ekspresi protein NS1 secara semikuantitatif dengan uji *sandwich* ELISA pada sel Vero76 dan A549 meningkat seiring peningkatan titer virus.
4. Hasil deteksi genom secara kualitatif menunjukkan RNA genom virus dengue pada sel Vero76 dan A549 berhasil dideteksi menggunakan RT-PCR.
5. Sel A549 dapat diajukan sebagai sel alternatif untuk mendukung pertumbuhan virus dengue secara *in vitro*.

5.2 Saran

1. Perlu dilakukan pengulangan *batch* uji pertumbuhan kinetik untuk mengonfirmasi data yang ada.
2. Perlu dilakukan uji pertumbuhan kinetik pada virus dengue lokal.
3. Perlu dilakukan *real-time* PCR untuk menguantifikasi jumlah RNA genom virus dengue secara akurat.
4. Perlu dilakukan analisis lebih jauh mengenai sel A549 untuk memberikan informasi pendukung sebagai sel alternatif yang mampu mendukung pertumbuhan virus dengue secara *in vitro*.

DAFTAR REFERENSI

- Alcon, S., A. Talarmin, M. Debruyne, A. Falconar, V. Deubel & M. Flamand. 2002. Enzyme-linked immunosorbent assay specific to dengue virus type 1 nonstructural protein NS1 reveals circulation of the antigen in the blood during the acute phase of disease in patients experiencing primary or secondary infections. *Journal of Clinical Microbiology* **40**(2): 376--381.
- ATCC (=American Type Culture Collection). 2010a. CCL-10: 1 hlm.
<http://www.atcc.org/ATCCAdvancedCatalogSearch/ProductDetails/tabid/452/Default.aspx?ATCCNum=CCL-10&Template=cellBiology>. 30 Oktober 2010, pk.18.18 WIB.
- ATCC (=American Type Culture Collection). 2010b. CRL-1587: 1 hlm.
<http://www.atcc.org/ATCCAdvancedCatalogSearch/ProductDetails/tabid/452/Default.aspx?ATCCNum=CRL-1587&Template=cellBiology>. 13 Februari 2011, pk.08.12 WIB.
- ATCC (=American Type Culture Collection). 2010c. CCL-34: 1 hlm.
<http://www.atcc.org/ATCCAdvancedCatalogSearch/ProductDetails/tabid/452/Default.aspx?ATCCNum=CCL-34&Template=cellBiology>. 13 Februari 2011, pk.08.01 WIB.
- ATCC (=American Type Culture Collection). 2010d. HB-8065: 1 hlm.
<http://www.atcc.org/ATCCAdvancedCatalogSearch/ProductDetails/tabid/452/Default.aspx?ATCCNum=HB-8065&Template=cellBiology>. 13 Februari 2011, pk.08.05 WIB.
- ATCC (=American Type Culture Collection). 2010e. CRL-1573: 1 hlm.
<http://www.atcc.org/ATCCAdvancedCatalogSearch/ProductDetails/tabid/452/Default.aspx?ATCCNum=CRL-1573&Template=cellBiology>. 13 Februari 2011, pk.08.22 WIB.
- ATCC (=American Type Culture Collection). 2010f. CCL-185: 1 hlm.
<http://www.atcc.org/ATCCAdvancedCatalogSearch/ProductDetails/tabid/452/Default.aspx?ATCCNum=CCL-185&Template=cellBiology>. 13 Februari 2011, pk.08.18 WIB.

- Avirutnan, P., L. Zhang, N. Punyadee, A. Manuyakorn, C. Puttikhunt, W. Kasinrerak, P. Malasit, J.P. Atkinson & M.S. Diamond. 2007. Secreted NS1 of dengue virus attaches to the surface of cells via interactions with heparan sulfate and chondroitin sulfate E. *Public Library of Science Pathogens* **3**(1): 1798--1812.
- Barker, K. 1998. *At the bench a laboratory navigator*. Cold Spring Harbor Press, New York: xiv + 460 hlm.
- Bhamarapavati, N. 1997. Pathology of dengue infections. *Dalam: Gubler, D.J. & G. Kuno (eds.). 1997. Dengue and dengue hemorrhagic fever*. CAB International, New York: 115--131.
- Bio-Rad. 2008. *PlateliaTM dengue NS1 Ag handbook*. Bio-Rad Laboratories Inc., California: 87 hlm.
- Biron, C.A. & Sen, G.C. 2007. Innate responses to viral infections. *Dalam: Knipe, D.M. & P.M. Howley (eds.). 2007. Fields virology*. 5th ed. Lippincott Williams & Wilkins, Massachusetts: 250--274 hlm.
- Butler, M. 2005. *Animal cell culture and technology*. 2nd ed. Bios Scientific Publishers, New York: x + 299 hlm.
- Campbell, S. & M.L. Landry. 2006. Rapid antigen tests. *Dalam: Tang, Y.W. & C.W. Stratton. 2006. Advanced techniques in diagnostic microbiology*. Springer, New York: 23--41.
- Chakraborty, T. 2008. *Deadly diseases and epidemics: Dengue fever and other hemorrhagic viruses*. Infobase Publishing, New York: 102 hlm.
- Chang, G.J. 1997. Molecular biology of dengue viruses. *Dalam: Gubler, D.J. & G. Kuno (eds.). 1997. Dengue and dengue hemorrhagic fever*. CAB International, New York: 175--198.
- Dahlan, M.S. 2004. *Statistika untuk kedokteran dan kesehatan: Uji hipotesis dengan menggunakan SPSS*. Arkans, Jakarta: xvi + 180 hlm.
- Das, D., S. Mongkolaungkoon & M.R. Suresh. 2009. Super induction of dengue virus NS1 protein in *E. coli*. *Elsevier* **2**(3): 1--7.
- Davies, H.W., G. Appleyard, P. Cunningham & M.S. Pereira. 1978. The use of a continuous cell line for the isolation of influenza viruses. *Buletin of World Health Organization* **56**(6): 991--993.

- Davis, L., M. Kuehl & J. Battey. 1994. *Basic methods: Molecular biology*. 2nd ed. Appleton & Lange, Norwola: xii + 777 hlm.
- De Clercq, E. & P. De Somer. 1973. Relationship between cell-interaction and antiviral activity of polyribonucleosinic acid-polyribocytidylic acid in different cell cultures. *Journal of General Virology* **19**: 113--123.
- Desmyter, J., J.L. Melnick & W.L. Rawls. 1968. Defectiveness of interferon production and of rubella virus interference in a line of African green monkey kidney cells (Vero). *Journal of Virology* **2**(10): 955--961.
- Diamond, M.S., D. Edgil, T.G. Roberts, B. Lu & E. Harris. 2000. Infection of human cells by dengue virus is modulated by different cell types and viral strains. *Journal of General Virology* **74**(17): 7814--7823.
- Diamond, M.S. & E. Harris. 2001. Interferon inhibits dengue virus infection by preventing translation of viral RNA through a PKR-independent mechanism. *Virology* **289**(2): 297--311.
- Emeny, J.M. & M.J. Morgan. 1979. Regulation of the interferon system: Evidence that Vero cells have a genetic defect in interferon production. *Journal of General Virology* **43**: 247--252.
- Fairbanks, J. D. & W. R. Andersen. 1999. *Genetics the continuity of life*. Brooks/Cole Publishing Company, Pacific Grove: xix + 820 hlm.
- Fink, J., F. Gu, L. Ling, T. Tolfvenstam, F. Olfat, K.C. Chin, P. Aw, J. George, V. A. Kuznetsov, M. Schreiber, S.G. Vasudevan & M.L. Hibberd. 2007. Host gene expression profiling of dengue virus infection in cell lines and patients. *Public Library of Science Neglected Tropical Diseases* **1**(2): 1--11.
- Flamand, M., F. Megret, M. Mathieu, J. Lepault, F.A. Rey & V. Deubel. 1999. Dengue virus type 1 nonstructural glycoprotein NS1 is secreted from mammalian cells as a soluble hexamer in a glycosylation-dependent fashion. *Journal of Virology* **73**(7): 6104--6110.
- Freshney, R.I. 2005. *Culture of animal cells: A manual of basic technique*. 5th ed. John Wiley & Sons Inc., New York: 580 hlm.
- Gubler, D.J. 1998. Dengue and dengue hemorrhagic fever. *Clinical Microbiology Reviews* **11**(3): 480--498.

- Henchal, E.A. & J.R. Putnak. 1990. The dengue virus. *Clinical Microbiology Reviews* **3**(4): 376--396.
- Herzog, P., C. Drosten & M.A. Müller. 2008. Plaque assay for human *Coronavirus NL63* using human colon carcinoma cells. *Virology Journal* **5**(138): 1--9.
- Igarashi, A. 1978. Isolation of a single's *Aedes albopictus* cell clone sensitive to dengue and chikungunya viruses. *Journal of General Virology* **40**: 531--544.
- Invitrogen. 2001. RNaseOUT™ recombinant ribonuclease inhibitor: 2 hlm. <http://tools.invitrogen.com/content/sfs/manuals/10777019.pdf>. 14 Januari 2011, pk 13.15 WIB.
- Invitrogen. 2003. SuperScript® III one-step R-TPCR system with platinum® Taq DNA polymerase: 4 hlm. http://tools.invitrogen.com/content/sfs/manuals/superscriptIII_onestepRTPCR_man.pdf. 21 Januari 2011, pk. 14.05 WIB.
- Jessie, K., M.Y. Fong, S. Devi, S.K. Lam & K.T. Wong. 2004. Localization of dengue virus in naturally infected human tissues by immunohistochemistry and in situ hybridization. *Journal of Infectious Diseases* **189**: 1411--1418.
- Kudesia, G. & T. Wreghitt. 2009. Clinical and diagnostic virology. Cambridge University Press, New York: x + 249 hlm.
- Kuhn, R.J., Wei Zhang, M.G. Rossmann, S.V. Pletnev, J. Corver, E. Lenches, C.T. Jones, S. Mukhopadhyay, P.R. Chipman, E.G. Strauss, T.S. Baker, & J.H. Strauss. 2002. Structure of dengue virus: Implications for *Flavivirus* organization, maturation, and fusion. *Cell* **108**: 717--725.
- Kuno, G., G.J Chang, K.R. Tsuchiya, N. Karabatsos & C.B Cropp. 1998. Phylogeny of the genus *Flavivirus*. *Journal of Virology* **72**(1): 73--83.
- Kurane, I. & F.A. Ennis. 1997. Immunopathogenesis of dengue virus infections. *Dalam*: Gubler, D.J. & G. Kuno (eds.). 1997. *Dengue and dengue hemorrhagic fever*. CAB International, New York: 273--290.
- Lai, Y.L., Y.K. Chung, H.C. Tan, H.F. Yap, G. Yap, E.E. Ooi & L.C. Ng. 2007. Cost-effective real-time reverse transcriptase PCR (RT-PCR) to screen for dengue virus followed by rapid single-tube multiplex RT-PCR for

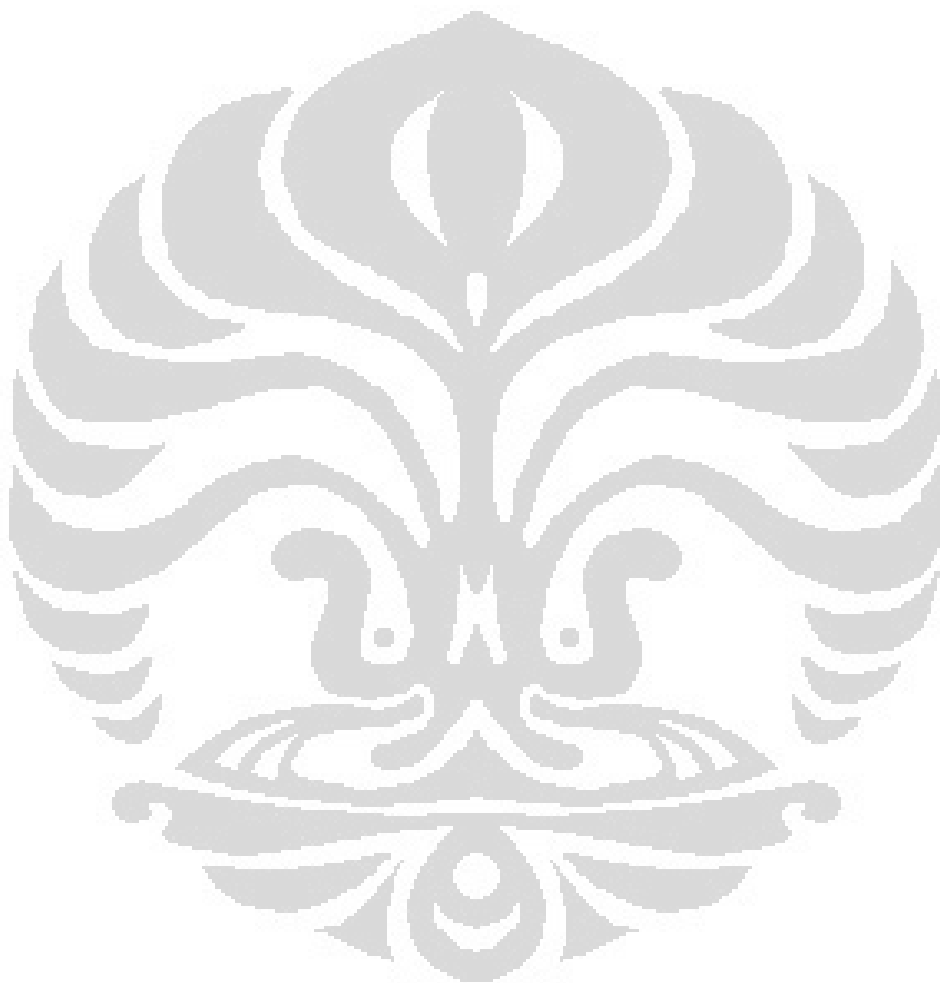
- serotyping of the virus. *Journal of Clinical Microbiology* **45**(3): 935--941.
- Lambeth, C. R., L. J. White, R. E. Johnston & A. M. de Silva. 2005. Flow cytometry-based assay for titrating dengue virus. *Journal of Clinical Microbiology* **43**(7): 3267--3272.
- Lanciotti, R.S., C.H. Calisher, D.J. Gubler, G.-J. Chang & A.V. Vorndam. 1992. Rapid detection and typing of dengue viruses from clinical samples by using reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *Journal of Clinical Microbiology* **30**(3): 545--551.
- Leitmeyer, K.C., D.W. Vaughn, D.M. Watts, R. Salas, I.V. de Chacon, C. Ramos & R.R. Hesse. 1999. Dengue virus structural differences that correlate with pathogenesis. *Journal of Virology* **73**(6): 4738--4747.
- Libraty, D.H., P.R. Young, D. Pickering, T.P. Endy, S. Kalayanarooj, S. Green, D.W. Vaughn, A. Nisalak, F.A. Ennis & A.L. Rothman. 2002. High circulating levels of the dengue virus nonstructural protein NS1 early in dengue illness correlate with the development of dengue hemorrhagic fever. *The Journal of Infectious Diseases* **186**(8): 1165--1168.
- Lindenbach, B.D., H.J. Thiel & C.M. Rice. 2007. Flaviviridae: The viruses and their replication. *Dalam: Knipe, D.M & P.M. Howley (eds.). 2007. Fields virology*. 5th ed. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia: 1101-1152.
- Mahy, B.W.J. & H.O. Kangro. 1996. *Virology methods manual*. Academic Press, San Diego: x + 374 hlm.
- Marianneau, P., F. Megret, R. Olivier, D. M. Morens & V. Deube. 1996. Dengue 1 virus binding to human hepatoma HepG2 and simian Vero cell surfaces differs. *Journal of General Virology* **77**: 2547--2554.
- Mather, J.P. & P.E. Roberts. 1998. *Introduction to cell and tissue culture: Theory and technique*. Plenum Press, New York: xv + 239 hlm.
- Matrosovich, M., T. Matrosovich, W. Garten & H.D. Klenk. 2006. New low-viscosity overlay medium for viral plaque assays. *Virology Journal* **3**(63): 1--7.

- Mukhopadhyay, S., R.J. Khun & M.G. Rossmann. 2005. A structural perspective of the *Flavivirus* life cycle. *Nature Reviews* **3**: 13--22.
- Murphy, F. A., E.P.J. Gibbs, M.C. Horzinek & M.J. Studdert. 2008. *Veterinary virology*. 3rd ed. Academic Press, California: x + 629 hlm.
- Noisakran, S., N. Onlamoon, P. Songprakhon, H-M. Hsiao, K. Chokephaibulkit & G.C. Perng. 2010. Cells in dengue virus infection in vivo. *Advances in Virology Reviews*: 1--15.
- Novoa, R.R., G. Calderita, R. Arranz, J. Fountana, H. Granzowt & C. Risco. 2005. Virus factories: Associations of cell organelles for viral replication and morphogenesis. *Biology Cell Review* **97**(2): 147--172.
- Palese, P. & M.L. Shaw. 2007. Orthomyxoviridae: The viruses and their replication. *Dalam*: Knipe, D.M. & P.M. Howley (eds.). 2007. *Fields virology*. 5th ed. Lippincott Williams & Wilkins, Massachusetts: 1648--1648.
- Qi, R.F., L. Zhang & C.W. Chi. 2008. Biological characteristics of dengue virus and potential targets for drug design. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica* **40**(2): 91--101.
- QIAGEN. 2005. *QIAamp® viral RNA mini kit handbook*. 2nd ed. QIAGEN Companies, Hilden: 43 hlm.
- QIAGEN. 2010. *HotStarTaq® PCR Handbook*. QIAGEN Companies, Hilden: 44 hlm.
- Rico-Hesse, R. 2009. Dengue virus markers of virulence and pathogenicity. *Future Virology* **4**(6): 1--13.
- Rothman, A.L. 1997. Viral pathogenesis of dengue infections. *Dalam*: Gubler, D.J. & G. Kuno (eds.). 1997. *Dengue and dengue hemorrhagic fever*. CAB International, New York: 245--271.
- Ryan, J.A. 2008. Introduction to animal cell culture. *Corning Technical Bulletin* **3**(8): 1--8.
- Sambrook, J. & D.W. Russel. 2001a. *Molecular cloning: A laboratory manual*. Vol. 1. 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York: xxvii + 1.1--7.94 + I.44 hlm.

- Sambrook, J. & D.W. Russel. 2001b. *Molecular cloning: A laboratory manual*. Vol. 2. 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York: xxvii + 8.1--14.53 + I.44 hlm.
- Setiati, T.E, J.F.P. Wagenaar, M.D de Kruif, A.T.A. Mairuhu, E.C.M. van Gorp & A. Soemantri. 2006. Changing epidemiology of dengue hemorrhagic fever in Indonesia. *Dengue Bulletin* **30**: 1--14.
- Shu, P.Y & J.H. Huang. 2004. Current advances in dengue diagnosis. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* **11**(4): 642--650.
- Sinha, B.K. & R. Kumar. 2008. *Principles of animal cell culture*. International Book Distributing Co., India: xxii + 282 hlm.
- Smith, C.D., D.W. Craft, R.S. Shiromoto & P.O. Yan. 1986. Alternative cell line for virus isolation. *Journal of Clinical Microbiology* **24**(2): 265--268.
- Tang, Y.B., Z. Kou, F. Zhang, X. Yao, S.Y. Liu, J. Ma, Y. Zhou, W. Zhao, X. Tang & X. Jin. 2010. Both viremia and cytokine levels associate with the lack of severe disease in secondary dengue 1 infection among adult chinese patients. *Public Library of Science One* **5**(12): 1--8.
- Taylor, G.R. 1993. Polymerase chain reaction: Basic principles and automation. *Dalam*: McPherson, M.J., P. Quirke, & G.R. Taylor (eds.). 1993. *PCR: A practical approach*. Oxford University Press, New York: 1--14.
- Uhnnoo, I., G. Wadell, L. Svensson & M.E. Johansson. 1984. Importance of enteric adenoviruses 40 and 41 in acute gastroenteritis in infants and young children. *Journal of Clinical Microbiology* **29**(3): 365--372.
- Umareddy, I., K.F. Tang, S.G. Vasudevan, S.Devi, M.L. Hibberd & F. Gu. 2008. Dengue virus regulates type I interferon signalling in a strain-dependent manner in human cell lines. *Journal of General Virology* **89**: 3052--3062.
- Vasilakis, N., E.R. Deardorff, J.L. Kenney, S.L. Rossi, K.A. Hanley & S.C. Weaver. 2009. Mosquitoes put the brake on arbovirus evolution: Experimental evolution reveals slower mutation accumulation in mosquito than vertebrate cells. *Public Library of Science Pathogens* **5**(6): 1--18.
- Vaughn, D.W., S. Green, S. Kalayanarooj, B.L. Innis, S. Nimmannitya, S. Suntayakorn, T. P. Endy, B. Raengsakulrach, A.L. Rothman, F.A. Ennis

- & A. Nisalak. 2000. Dengue viremia titer, antibody response pattern, and virus serotype correlate with disease severity. *The Journal of Infectious Diseases* **181**: 2--9.
- Voyles, B.A. 2002. *The biology of viruses*. 2nd ed. McGraw-Hill, Singapura: xv + 408 hlm.
- Wadell, G., M.K. Cooney, A.C. Linhares, L. de Silva, M.G. Kennet, R. Kono, R. Gui-Fang, K. Lindman, J.P. Nascimento, B.D. Schoub & C.D Smith. 1985. Molecular epidemiology of adenoviruses: Global distribution of *Adenovirus 7* genome types. *Journal of Clinical Microbiology* **21**(3): 403--408.
- Wagner, E.K., M.J. Hewlett, D.C. Bloom & D. Camerini. 2008. *Basic virology*. 3rd ed. Blackwell Publishing, Malden: xix + 550 hlm.
- Wang, Y.F. 2006. Advanced antibody detection. *Dalam*: Tang, Y.W. & C.W. Stratton (eds.). 2006. *Advanced techniques in diagnostic microbiology*. Springer, New York: 42--62.
- Westaway, E.G & J. Blok. 1997. Taxonomy and evolutionary relationship of flaviviruses. *Dalam*: Gubler, D.J. & G. Kuno (eds.). 1997. *Dengue and dengue hemorrhagic fever*. CAB International, New York: 147--173.
- White, L.A. 1987. Susceptibility of *Aedes albopictus* C6/36 to viral infection. *Journal of Clinical Microbiology* **25**(7): 1221--1224.
- WHO (=World Health Organization). 1997. *Dengue hemorrhagic fever: Diagnosis, treatment, prevention, and control*. 2nd ed. WHO, Geneva: viii + 84 hlm.
- WHO-SEARO (=World Health Organization - South East Asian Regional Office). 2010. Situation update of dengue in the SEA Region: 8 hlm. [http://www.searo.who.int/LinkFiles/Dengue Dengue update SEA 2010 .pdf](http://www.searo.who.int/LinkFiles/Dengue%20Dengue%20update%20SEA%202010.pdf). 11 Agustus 2011, pk. 12.56.
- Young, P.R., P.A. Hilditch, C. Bletchly & W. Halloran. 2000. An antigen capture enzyme-linked immunosorbent assay reveals high levels of the dengue virus protein NS1 in the sera of infected patients. *Journal of Clinical Microbiology* **38**(3): 1053--1057.

Yuwono, T. 2006. *Teori dan aplikasi polymerase chain reaction*. Penerbit Andi, Yogyakarta: viii + 240 hlm.



Lampiran 1

Komponen kit yang digunakan dalam penelitian

Kit	Produsen	Komponen Kit
QIAamp® <i>Viral RNA Mini Spin Kit</i>	QIAGEN GmbH, Hilden, Germany	QIAamp <i>spin columns</i> <i>Collection tubes</i> (2 ml) <i>Buffer AVL</i> <i>Buffer AW1</i> <i>Buffer AW2</i> <i>Buffer AVE</i> <i>Carrier RNA (poly-A)</i>
SuperScript™ III <i>Reverse Transcriptase</i>	Invitrogen, Carlsbad, USA	SuperScript™ III RT (200 U/μl) 5X First-Strand <i>buffer</i> (250 mM Tris-HCL, 375 mM KCL, 15 mM MgCl ₂ 0,1 M DTT)
HotStar <i>Taq DNA Polymerase</i>	QIAGEN GmbH, Hilden, Germany	HotStar <i>Taq DNA polymerase</i> (200 U/μl) 10X PCR <i>buffer with</i> 15 mM MgCl ₂ 5X Q-Solution 25 mM MgCl ₂
Platelia™ Dengue NS1 Ag	Bio-Rad Laboratories Inc., California, USA	<i>Microplate</i> (R1) 20X <i>Consentrated washing solution</i> (R2) <i>Negative control</i> (R3) <i>Calibrator</i> (R4) <i>Positive control</i> (R5) 50X <i>Conjugated</i> (R6) <i>Diluent</i> (R7) <i>Chromogen TMB</i> (R8) <i>Stopping solution</i> (R9) <i>Adhesive film</i>

Lampiran 2

Sekuen primer yang digunakan dalam penelitian

Primer	Sekuen	Ukuran
Pan-dengue F	5'-TTGAGTAAACYRTGCTGCCTGTAGCTC-3'	27 bp
Pan dengue R	5'-GAGACAGCAGGATCTCTGGTCTYTC-3'	25 bp

[Sumber: Lai *dkk.* 2002: 936.]

Lampiran 3

Komponen *master mix* I dan II reaksi *reverse transcriptase*

Master mix	Komponen	Volume (μ l)
I	0.1 M DTT	1
	10 mM dNTP <i>mix</i>	1
	Pan-dengue <i>reverse</i> primer	0.5
	RNA	6
	<i>Nuclease-free water</i>	6.5
II	5X First Strand <i>Buffer</i>	4
	RNAse Out	0.5
	<i>Superscript</i> III RT	0.5
	Total	20

[Sumber: SOP NEHCRI.]

Lampiran 4

Komponen *master mix* PCR untuk deteksi virus dengue

Komponen	Volume (μ l)
10X Roche <i>Buffer</i>	2.5
10 mM dNTP Mix	0.5
25 mM MgCl ₂	1.5
cDNA	2
Pan-dengue <i>forward</i> primer (10 pmol)	0.3
Pan-dengue <i>reverse</i> primer (10 pmol)	0.3
HotStar DNA Polymerase, 5 U/ μ l	0.15
<i>Nuclease-free water</i>	17.75
Total	25

[Sumber: SOP NEHCRI.]

Lampiran 5
Perhitungan *plaque assay* virus stok

Tujuan:

Untuk mengetahui titer virus dalam supernatan virus stok dan 288 sampel uji pertumbuhan kinetik yang diteliti.

Rumus:

$$\text{Titer virus (pfu)/(ml)} = \frac{\text{Jumlah plaque (pfu)}}{\text{Faktor dilusi} \times \text{Volume inokulum (ml)}}$$

Perhitungan:

1. Virus D1-Westpac

Diketahui:

Jumlah plaque ulangan 1 = 11

Jumlah plaque ulangan 2 = 8

Jumlah plaque ulangan 3 = 12

Faktor dilusi = 10^{-6}

Volume inokulum = 0,2 ml

Maka,

$$\text{Titer virus D1-Westpac} = \frac{\left(\frac{(11+8+12)}{3} \right) \text{ pfu}}{10^{-6} \times 0,2 \text{ ml}} = 5,167 \times 10^7 \text{ pfu/ml}$$

2. Virus D2-TSV01

Diketahui:

Jumlah plaque ulangan 1 = 2

Jumlah plaque ulangan 2 = 3

Jumlah plaque ulangan 3 = 2

Faktor dilusi = 10^{-6}

Volume inokulum = 0,2 ml

Maka,

$$\text{Titer virus D2-TSV01} = \frac{\left(\frac{(2+3+2)}{3} \right) \text{ pfu}}{10^{-6} \times 0,2 \text{ ml}} = 1,167 \times 10^7 \text{ pfu/ml}$$

Lanjutan

3. Virus D3-H87

Diketahui:

Jumlah plaque ulangan 1 = 4

Jumlah plaque ulangan 2 = 5

Jumlah plaque ulangan 3 = 5

Faktor dilusi = 10^{-4}

Volume inokulum = 0,2 ml

Maka,

$$\text{Titer virus D3-H87} = \frac{\left(\frac{(4+5+5)}{3} \right) \text{ pfu}}{10^{-4} \times 0,2 \text{ ml}} = 2,33 \times 10^5 \text{ pfu/ml}$$

4. Virus D4-H241

Diketahui:

Jumlah plaque ulangan 1 = 1

Jumlah plaque ulangan 2 = 1

Jumlah plaque ulangan 3 = 1

Faktor dilusi = 10^{-4}

Volume inokulum = 0,2 ml

Maka,

$$\text{Titer virus D4-H241} = \frac{\left(\frac{(1+1+1)}{3} \right) \text{ pfu}}{10^{-5} \times 0,2 \text{ ml}} = 5 \times 10^5 \text{ pfu/ml}$$

Lampiran 6

Perhitungan volume inokulum sel pada uji kinetik

Tujuan:

Untuk mengetahui volume inokulum sel yang diperlukan untuk *seeding* atau penanaman sel sekitar 5×10^5 sel/*well*. Sel tersebut akan diinfeksi tiap serotipe virus dengue.

Rumus:

$$\text{Jumlah sel (sel/ml)} = \frac{\text{Jumlah sel yang terhitung}}{\text{Jumlah kotak yang dihitung} \times 10^{-4}} \times \text{faktor dilusi}$$

$$\text{Volume inokulum sel (ml/well)} = \frac{\text{Jumlah sel yang dikehendaki (sel/well)}}{\text{Jumlah sel hasil perhitungan (sel/ml)}}$$

Perhitungan:

Perhitungan sel dilakukan dengan,

Faktor dilusi = 10 (20 μ l sampel + 180 μ l medium)

Jumlah kotak yang dihitung = 10 kotak (5 kotak pada kamar atas + 5 kotak kamar bawah)

1. Volume inokulum sel untuk infeksi D1-Westpac

a. Sel C6/36

Jumlah sel yang terhitung = 344

$$\text{Jumlah sel} = \frac{344}{10 \times 10^{-4}} \times 10 = 3,44 \times 10^6 \text{ sel/ml}$$

$$\text{Volume inokulum} = \frac{5 \times 10^5 \text{ sel/well}}{3,44 \times 10^6 \text{ sel/ml}} = 0,1453 \text{ ml/well} = 145,3 \mu\text{l/well}$$

b. Sel Vero76

Jumlah sel yang terhitung = 219

$$\text{Jumlah sel} = \frac{219}{10 \times 10^{-4}} \times 10 = 2,19 \times 10^6 \text{ sel/ml}$$

Lanjutan

$$\text{Volume inokulum} = \frac{5 \times 10^5 \text{ sel/well}}{2,19 \times 10^6 \text{ sel/ml}} = 0,2283 \text{ ml/well} = 228,3 \text{ } \mu\text{l/well}$$

c. Sel MDCK

Jumlah sel yang terhitung = 281

$$\text{Jumlah sel} = \frac{281}{10 \times 10^{-4}} \times 10 = 2,81 \times 10^6 \text{ sel/ml}$$

$$\text{Volume inokulum} = \frac{5 \times 10^5 \text{ sel/well}}{2,81 \times 10^6 \text{ sel/ml}} = 0,1779 \text{ ml/well} = 177,9 \text{ } \mu\text{l/well}$$

d. Sel 293

Jumlah sel yang terhitung = 211

$$\text{Jumlah sel} = \frac{211}{10 \times 10^{-4}} \times 10 = 2,11 \times 10^6 \text{ sel/ml}$$

$$\text{Volume inokulum} = \frac{5 \times 10^5 \text{ sel/well}}{2,11 \times 10^6 \text{ sel/ml}} = 0,2369 \text{ ml/well} = 236,9 \text{ } \mu\text{l/well}$$

e. Sel HepG2

Jumlah sel yang terhitung = 228

$$\text{Jumlah sel} = \frac{228}{10 \times 10^{-4}} \times 10 = 2,28 \times 10^6 \text{ sel/ml}$$

$$\text{Volume inokulum} = \frac{5 \times 10^5 \text{ sel/well}}{2,28 \times 10^6 \text{ sel/ml}} = 0,2193 \text{ ml/well} = 219,3 \text{ } \mu\text{l/well}$$

f. Sel A549

Jumlah sel yang terhitung = 273

$$\text{Jumlah sel} = \frac{326}{10 \times 10^{-4}} \times 10 = 2,73 \times 10^6 \text{ sel/ml}$$

$$\text{Volume inokulum} = \frac{5 \times 10^5 \text{ sel/well}}{2,73 \times 10^6 \text{ sel/ml}} = 0,1831 \text{ ml/well} = 183,1 \text{ } \mu\text{l/well}$$

2. Volume inokulum sel untuk infeksi D2-TSV01 dan D3-H87

a. Sel C6/36

Jumlah sel yang terhitung = 317

$$\text{Jumlah sel} = \frac{317}{10 \times 10^{-4}} \times 10 = 3,17 \times 10^6 \text{ sel/ml}$$

$$\text{Volume inokulum} = \frac{5 \times 10^5 \text{ sel/well}}{3,17 \times 10^6 \text{ sel/ml}} = 0,1577 \text{ ml/well} = 157,7 \text{ } \mu\text{l/well}$$

Lanjutan

b. Sel Vero76

Jumlah sel yang terhitung = 361

$$\text{Jumlah sel} = \frac{361}{10 \times 10^{-4}} \times 10 = 3,61 \times 10^6 \text{ sel/ml}$$

$$\text{Volume inokulum} = \frac{5 \times 10^5 \text{ sel/well}}{3,61 \times 10^6 \text{ sel/ml}} = 0,1385 \text{ ml/well} = 138,5 \mu\text{l/well}$$

c. Sel MDCK

Jumlah sel yang terhitung = 323

$$\text{Jumlah sel} = \frac{323}{10 \times 10^{-4}} \times 10 = 3,23 \times 10^6 \text{ sel/ml}$$

$$\text{Volume inokulum} = \frac{5 \times 10^5 \text{ sel/well}}{3,23 \times 10^6 \text{ sel/ml}} = 0,1548 \text{ ml/well} = 154,8 \mu\text{l/well}$$

d. Sel 293

Jumlah sel yang terhitung = 207

$$\text{Jumlah sel} = \frac{207}{10 \times 10^{-4}} \times 10 = 2,07 \times 10^6 \text{ sel/ml}$$

$$\text{Volume inokulum} = \frac{5 \times 10^5 \text{ sel/well}}{2,07 \times 10^6 \text{ sel/ml}} = 0,2415 \text{ ml/well} = 241,5 \mu\text{l/well}$$

e. Sel HepG2

Jumlah sel yang terhitung = 323

$$\text{Jumlah sel} = \frac{323}{10 \times 10^{-4}} \times 10 = 3,23 \times 10^6 \text{ sel/ml}$$

$$\text{Volume inokulum} = \frac{5 \times 10^5 \text{ sel/well}}{3,23 \times 10^6 \text{ sel/ml}} = 0,1548 \text{ ml/well} = 154,8 \mu\text{l/well}$$

f. Sel A549

Jumlah sel yang terhitung = 326

$$\text{Jumlah sel} = \frac{326}{10 \times 10^{-4}} \times 10 = 3,26 \times 10^6 \text{ sel/ml}$$

$$\text{Volume inokulum} = \frac{5 \times 10^5 \text{ sel/well}}{3,26 \times 10^6 \text{ sel/ml}} = 0,1534 \text{ ml/well} = 153,4 \mu\text{l/well}$$

3. Volume inokulum sel untuk infeksi D4-H241

a. Sel C6/36

Jumlah sel yang terhitung = 256

$$\text{Jumlah sel} = \frac{256}{10 \times 10^{-4}} \times 10 = 2,56 \times 10^6 \text{ sel/ml}$$

Lanjutan

$$\text{Volume inokulum} = \frac{5 \times 10^5 \text{ sel/well}}{2,56 \times 10^6 \text{ sel/ml}} = 0,1953 \text{ ml/well} = 195,3 \text{ } \mu\text{l/well}$$

b. Sel Vero76

Jumlah sel yang terhitung = 223

$$\text{Jumlah sel} = \frac{223}{10 \times 10^{-4}} \times 10 = 2,23 \times 10^6 \text{ sel/ml}$$

$$\text{Volume inokulum} = \frac{5 \times 10^5 \text{ sel/well}}{2,23 \times 10^6 \text{ sel/ml}} = 0,2242 \text{ ml/well} = 224,2 \text{ } \mu\text{l/well}$$

c. Sel MDCK

Jumlah sel yang terhitung = 149

$$\text{Jumlah sel} = \frac{149}{10 \times 10^{-4}} \times 10 = 1,49 \times 10^6 \text{ sel/ml}$$

$$\text{Volume inokulum} = \frac{5 \times 10^5 \text{ sel/well}}{1,49 \times 10^6 \text{ sel/ml}} = 0,3356 \text{ ml/well} = 335,6 \text{ } \mu\text{l/well}$$

d. Sel 293

Jumlah sel yang terhitung = 260

$$\text{Jumlah sel} = \frac{260}{10 \times 10^{-4}} \times 10 = 2,60 \times 10^6 \text{ sel/ml}$$

$$\text{Volume inokulum} = \frac{5 \times 10^5 \text{ sel/well}}{2,60 \times 10^6 \text{ sel/ml}} = 0,1923 \text{ ml/well} = 192,3 \text{ } \mu\text{l/well}$$

e. Sel HepG2

Jumlah sel yang terhitung = 225

$$\text{Jumlah sel} = \frac{225}{10 \times 10^{-4}} \times 10 = 2,25 \times 10^6 \text{ sel/ml}$$

$$\text{Volume inokulum} = \frac{5 \times 10^5 \text{ sel/well}}{2,25 \times 10^6 \text{ sel/ml}} = 0,222 \text{ ml/well} = 222,2 \text{ } \mu\text{l/well}$$

f. Sel A549

Jumlah sel yang terhitung = 222

$$\text{Jumlah sel} = \frac{222}{10 \times 10^{-4}} \times 10 = 2,22 \times 10^6 \text{ sel/ml}$$

$$\text{Volume inokulum} = \frac{5 \times 10^5 \text{ sel/well}}{2,22 \times 10^6 \text{ sel/ml}} = 0,2252 \text{ ml/well} = 225,2 \text{ } \mu\text{l/well}$$

Lanjutan

4. Volume inokulum sel untuk uji kinetik konfirmasi pada sel HepG2 dan MDCK

a. Sel HepG2

Jumlah sel yang terhitung = 132

$$\text{Jumlah sel} = \frac{132}{10 \times 10^{-4}} \times 10 = 1,32 \times 10^6 \text{ sel/ml}$$

$$\text{Volume inokulum} = \frac{5 \times 10^5 \text{ sel/well}}{1,32 \times 10^6 \text{ sel/ml}} = 0,3788 \text{ ml/well} = 378,8 \mu\text{l/well}$$

b. Sel MDCK

Jumlah sel yang terhitung = 206

$$\text{Jumlah sel} = \frac{206}{10 \times 10^{-4}} \times 10 = 2,06 \times 10^6 \text{ sel/ml}$$

$$\text{Volume inokulum} = \frac{5 \times 10^5 \text{ sel/well}}{2,06 \times 10^6 \text{ sel/ml}} = 0,2427 \text{ ml/well} = 242,7 \mu\text{l/well}$$

Lampiran 7

Perhitungan volume inokulum virus dengue pada uji kinetik

Tujuan:

Untuk mengetahui volume inokulum tiap serotipe virus dengue yang, yaitu sebanyak 0,01 moi, yang akan diinfeksi pada tiap galur sel.

Rumus:

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

Perhitungan:

1. Perhitungan volume inokulum D1-Westpac

$$\text{Titer virus} = 5,167 \times 10^7 \text{ pfu/ml}$$

$$\text{Jumlah sel} = 5 \times 10^5 \text{ sel/well}$$

$$\text{Multiplicity of infection (moi)} = 0,01 \text{ pfu/sel}$$

$$\begin{aligned} \text{Jumlah partikel virus yang diperlukan} &= \text{Jumlah sel} \times \text{moi} \\ &= 5 \times 10^5 \text{ sel/well} \times 0,01 \text{ pfu/sel} \\ &= 5 \times 10^3 \text{ pfu/well} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Volume inokulum virus} &= \frac{\text{Jumlah partikel virus yang diperlukan}}{\text{Titer virus}} \\ &= \frac{5 \times 10^3 \text{ pfu/well}}{5,167 \times 10^7 \text{ pfu/ml}} \\ &= 9,68 \times 10^{-5} \text{ ml/well} \\ &= 0,0968 \text{ } \mu\text{l/well} \end{aligned}$$

Stok virus didilusi 1000x, maka:

$$M1 \times V1 = M2 \times V2$$

$$5,167 \times 10^7 \text{ pfu/ml} \times 0,0968 \text{ } \mu\text{l/well} = 5,167 \times 10^4 \text{ pfu/ml} \times V2$$

$$V2 = \frac{5,167 \times 10^7 \text{ pfu/ml} \times 0,0968 \text{ } \mu\text{l/well}}{5,167 \times 10^4 \text{ pfu/ml}}$$

$$V2 = 98,6 \text{ } \mu\text{l/well}$$

$$\text{Volume inokulum total} = 200 \text{ } \mu\text{l/well}$$

$$\text{Volume inokulum virus untuk 75 well} = 98,6 \text{ } \mu\text{l/well} \times 75 \text{ well} = 7260 \text{ } \mu\text{l}$$

$$\text{Volume medium untuk 75 well} = (200 - 98,6) \text{ } \mu\text{l/well} \times 75 \text{ well} = 7740 \text{ } \mu\text{l}$$

Lanjutan

2. Perhitungan volume inokulum D2-TSV01

$$\text{Titer virus} = 1,167 \times 10^7 \text{ pfu/ml}$$

$$\text{Jumlah sel} = 5 \times 10^5 \text{ sel/well}$$

$$\text{Multiplicity of infection (moi)} = 0,01 \text{ pfu/sel}$$

$$\begin{aligned} \text{Jumlah partikel virus yang diperlukan} &= \text{Jumlah sel} \times \text{moi} \\ &= 5 \times 10^5 \text{ sel/well} \times 0,01 \text{ pfu/sel} \\ &= 5 \times 10^3 \text{ pfu/well} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Volume inokulum virus} &= \frac{\text{Jumlah partikel virus yang diperlukan}}{\text{Titer virus}} \\ &= \frac{5 \times 10^3 \text{ pfu/well}}{1,167 \times 10^7 \text{ pfu/ml}} \\ &= 4,28 \times 10^{-4} \text{ ml/well} \\ &= 0,428 \text{ } \mu\text{l/well} \end{aligned}$$

Stok virus didilusi 200x, maka:

$$M1 \times V1 = M2 \times V2$$

$$1,167 \times 10^7 \text{ pfu/ml} \times 0,428 \text{ } \mu\text{l/well} = 5,835 \times 10^4 \text{ pfu/ml} \times V2$$

$$V2 = \frac{1,167 \times 10^7 \text{ pfu/ml} \times 0,428 \text{ } \mu\text{l/well}}{5,835 \times 10^4 \text{ pfu/ml}}$$

$$V2 = 85,6 \text{ } \mu\text{l/well}$$

$$\text{Volume inokulum total} = 200 \text{ } \mu\text{l/well}$$

$$\text{Volume inokulum virus untuk 75 well} = 85,6 \text{ } \mu\text{l/well} \times 75 \text{ well} = 6420 \text{ } \mu\text{l}$$

$$\text{Volume medium untuk 75 well} = (200 - 85,6) \text{ } \mu\text{l/well} \times 75 \text{ well} = 8580 \text{ } \mu\text{l}$$

3. Perhitungan volume inokulum D3-H87

$$\text{Titer virus} = 2,33 \times 10^5 \text{ pfu/ml}$$

$$\text{Jumlah sel} = 5 \times 10^5 \text{ sel/well}$$

$$\text{Multiplicity of infection (moi)} = 0,01 \text{ pfu/sel}$$

$$\begin{aligned} \text{Jumlah partikel virus yang diperlukan} &= \text{Jumlah sel} \times \text{moi} \\ &= 5 \times 10^5 \text{ sel/well} \times 0,01 \text{ pfu/sel} \\ &= 5 \times 10^3 \text{ pfu/well} \end{aligned}$$

Lanjutan

$$\begin{aligned} \text{Volume inokulum virus} &= \frac{\text{Jumlah partikel virus yang diperlukan}}{\text{Titer virus}} \\ &= \frac{5 \times 10^3 \text{ pfu/well}}{2,33 \times 10^5 \text{ pfu/ml}} \\ &= 2,15 \times 10^{-2} \text{ ml/well} \\ &= 21,5 \text{ } \mu\text{l/well} \end{aligned}$$

Stok virus didilusi 5x, maka:

$$M1 \times V1 = M2 \times V2$$

$$2,33 \times 10^5 \text{ pfu/ml} \times 21,5 \text{ } \mu\text{l/well} = 4,66 \times 10^4 \text{ pfu/ml} \times V2$$

$$V2 = \frac{2,33 \times 10^5 \text{ pfu/ml} \times 21,5 \text{ } \mu\text{l/well}}{4,66 \times 10^4 \text{ pfu/ml}}$$

$$V2 = 107,5 \text{ } \mu\text{l/well}$$

$$\text{Volume inokulum total} = 200 \text{ } \mu\text{l/well}$$

$$\text{Volume inokulum virus untuk 75 well} = 107,5 \text{ } \mu\text{l/well} \times 75 \text{ well} = 8062,5 \text{ } \mu\text{l}$$

$$\text{Volume medium untuk 75 well} = (200 - 107,5) \text{ } \mu\text{l/well} \times 75 \text{ well} = 6937,5 \text{ } \mu\text{l}$$

4. Perhitungan volume inokulum D4-H241

$$\text{Titer virus} = 5 \times 10^5 \text{ pfu/ml}$$

$$\text{Jumlah sel} = 5 \times 10^5 \text{ sel/well}$$

$$\text{Multiplicity of infection (moi)} = 0,01 \text{ pfu/sel}$$

$$\begin{aligned} \text{Jumlah partikel virus yang diperlukan} &= \text{Jumlah sel} \times \text{moi} \\ &= 5 \times 10^5 \text{ sel/well} \times 0,01 \text{ pfu/sel} \\ &= 5 \times 10^3 \text{ pfu/well} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Volume inokulum virus} &= \frac{\text{Jumlah partikel virus yang diperlukan}}{\text{Titer virus}} \\ &= \frac{5 \times 10^3 \text{ pfu/well}}{5 \times 10^5 \text{ pfu/ml}} \\ &= 1 \times 10^{-2} \text{ ml/well} \\ &= 10 \text{ } \mu\text{l/well} \end{aligned}$$

Stok virus didilusi 10x, maka:

$$M1 \times V1 = M2 \times V2$$

$$5 \times 10^5 \text{ pfu/ml} \times 10 \text{ } \mu\text{l/well} = 5 \times 10^4 \text{ pfu/ml} \times V2$$

Lanjutan

$$V2 = \frac{5 \times 10^5 \text{ pfu/ml} \times 10 \text{ } \mu\text{l/well}}{5 \times 10^4 \text{ pfu/ml}}$$

$$V2 = 100 \text{ } \mu\text{l/well}$$

Volume inokulum total = 200 $\mu\text{l/well}$

Volume inokulum virus untuk 75 well = 100 $\mu\text{l/well} \times 75 \text{ well} = 7500 \text{ } \mu\text{l}$

Volume medium untuk 75 well = (200 - 100) $\mu\text{l/well} \times 75 \text{ well} = 7500 \text{ } \mu\text{l}$

5. Perhitungan volume inokulum virus untuk uji kinetik konfirmasi pada sel HepG2 dan MDCK

a. D2-NGC

Titer virus = $1,4 \times 10^6 \text{ pfu/ml}$

Jumlah sel = $5 \times 10^5 \text{ sel/well}$

Multiplicity of infection (moi) = 0,01 pfu/sel

Jumlah partikel virus yang diperlukan = Jumlah sel \times moi
 $= 5 \times 10^5 \text{ sel/well} \times 0,01 \text{ pfu/sel}$
 $= 5 \times 10^3 \text{ pfu/well}$

$$\begin{aligned} \text{Volume inokulum virus} &= \frac{\text{Jumlah partikel virus yang diperlukan}}{\text{Titer virus}} \\ &= \frac{5 \times 10^3 \text{ pfu/well}}{1,4 \times 10^6 \text{ pfu/ml}} \\ &= 3,57 \times 10^{-3} \text{ ml/well} \\ &= 3,57 \text{ } \mu\text{l/well} \end{aligned}$$

Stok virus didilusi 50x, maka:

$$M1 \times V1 = M2 \times V2$$

$$1,4 \times 10^6 \text{ pfu/ml} \times 3,57 \text{ } \mu\text{l/well} = 2,8 \times 10^4 \text{ pfu/ml} \times V2$$

$$V2 = \frac{1,4 \times 10^6 \text{ pfu/ml} \times 3,57 \text{ } \mu\text{l/well}}{2,8 \times 10^4 \text{ pfu/ml}}$$

$$V2 = 178,6 \text{ } \mu\text{l/well}$$

Volume inokulum total = 200 $\mu\text{l/well}$

Volume inokulum virus untuk 5 well = 178,6 $\mu\text{l/well} \times 5 \text{ well} = 893 \text{ } \mu\text{l}$

Volume medium untuk 5 well = (200 - 178,6) $\mu\text{l/well} \times 5 \text{ well} = 107 \text{ } \mu\text{l}$

Lanjutan

b. D2-0502

$$\text{Titer virus} = 1,5 \times 10^6 \text{ pfu/ml}$$

$$\text{Jumlah sel} = 5 \times 10^5 \text{ sel/well}$$

$$\text{Multiplicity of infection (moi)} = 0,01 \text{ pfu/sel}$$

$$\begin{aligned} \text{Jumlah partikel virus yang diperlukan} &= \text{Jumlah sel} \times \text{moi} \\ &= 5 \times 10^5 \text{ sel/well} \times 0,01 \text{ pfu/sel} \\ &= 5 \times 10^3 \text{ pfu/well} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Volume inokulum virus} &= \frac{\text{Jumlah partikel virus yang diperlukan}}{\text{Titer virus}} \\ &= \frac{5 \times 10^3 \text{ pfu/well}}{1,5 \times 10^6 \text{ pfu/ml}} \\ &= 3,33 \times 10^{-3} \text{ ml/well} \\ &= 3,33 \text{ } \mu\text{l/well} \end{aligned}$$

Stok virus didilusi 2x, maka:

$$M1 \times V1 = M2 \times V2$$

$$1,5 \times 10^6 \text{ pfu/ml} \times 3,33 \text{ } \mu\text{l/well} = 3 \times 10^4 \text{ pfu/ml} \times V2$$

$$V2 = \frac{1,5 \times 10^6 \text{ pfu/ml} \times 3,33 \text{ } \mu\text{l/well}}{3 \times 10^4 \text{ pfu/ml}}$$

$$V2 = 166,67 \text{ } \mu\text{l/well}$$

$$\text{Volume inokulum total} = 200 \text{ } \mu\text{l/well}$$

$$\text{Volume inokulum virus untuk 5 well} = 166,67 \text{ } \mu\text{l/well} \times 5 \text{ well} = 833,35 \text{ } \mu\text{l}$$

$$\text{Volume medium untuk 5 well} = (200 - 166,67) \text{ } \mu\text{l/well} \times 5 \text{ well} = 166,65 \text{ } \mu\text{l}$$

c. D3-22366

$$\text{Titer virus} = 1 \times 10^5 \text{ pfu/ml}$$

$$\text{Jumlah sel} = 5 \times 10^5 \text{ sel/well}$$

$$\text{Multiplicity of infection (moi)} = 0,01 \text{ pfu/sel}$$

$$\begin{aligned} \text{Jumlah partikel virus yang diperlukan} &= \text{Jumlah sel} \times \text{moi} \\ &= 5 \times 10^5 \text{ sel/well} \times 0,01 \text{ pfu/sel} \\ &= 5 \times 10^3 \text{ pfu/well} \end{aligned}$$

Lanjutan

$$\begin{aligned} \text{Volume inokulum virus} &= \frac{\text{Jumlah partikel virus yang diperlukan}}{\text{Titer virus}} \\ &= \frac{5 \times 10^3 \text{ pfu/well}}{1 \times 10^5 \text{ pfu/ml}} \\ &= 5 \times 10^{-2} \text{ ml/well} \\ &= 50 \text{ } \mu\text{l/well} \end{aligned}$$

Stok virus didilusi 2x, maka:

$$M1 \times V1 = M2 \times V2$$

$$1 \times 10^5 \text{ pfu/ml} \times 50 \text{ } \mu\text{l/well} = 5 \times 10^4 \text{ pfu/ml} \times V2$$

$$V2 = \frac{1 \times 10^5 \text{ pfu/ml} \times 50 \text{ } \mu\text{l/well}}{5 \times 10^4 \text{ pfu/ml}}$$

$$V2 = 100 \text{ } \mu\text{l/well}$$

$$\text{Volume inokulum total} = 200 \text{ } \mu\text{l/well}$$

$$\text{Volume inokulum virus untuk 5 well} = 100 \text{ } \mu\text{l/well} \times 5 \text{ well} = 500 \text{ } \mu\text{l}$$

$$\text{Volume medium untuk 5 well} = (200 - 100) \text{ } \mu\text{l/well} \times 5 \text{ well} = 500 \text{ } \mu\text{l}$$

d. D3-0388

$$\text{Titer virus} = 1,25 \times 10^7 \text{ pfu/ml}$$

$$\text{Jumlah sel} = 5 \times 10^5 \text{ sel/well}$$

$$\text{Multiplicity of infection (moi)} = 0,01 \text{ pfu/sel}$$

$$\begin{aligned} \text{Jumlah partikel virus yang diperlukan} &= \text{Jumlah sel} \times \text{moi} \\ &= 5 \times 10^5 \text{ sel/well} \times 0,01 \text{ pfu/sel} \\ &= 5 \times 10^3 \text{ pfu/well} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Volume inokulum virus} &= \frac{\text{Jumlah partikel virus yang diperlukan}}{\text{Titer virus}} \\ &= \frac{5 \times 10^3 \text{ pfu/well}}{1,25 \times 10^7 \text{ pfu/ml}} \\ &= 4 \times 10^{-4} \text{ ml/well} \\ &= 0,4 \text{ } \mu\text{l/well} \end{aligned}$$

Stok virus didilusi 400x, maka:

$$M1 \times V1 = M2 \times V2$$

$$1,25 \times 10^7 \text{ pfu/ml} \times 0,4 \text{ } \mu\text{l/well} = 3,125 \times 10^4 \text{ pfu/ml} \times V2$$

$$V2 = \frac{1,25 \times 10^7 \text{ pfu/ml} \times 0,4 \text{ } \mu\text{l/well}}{3,125 \times 10^4 \text{ pfu/ml}}$$

$$V2 = 160 \text{ } \mu\text{l/well}$$

Lanjutan

Volume inokulum total = 200 $\mu\text{l/well}$

Volume inokulum virus untuk 5 well = 160 $\mu\text{l/well} \times 5 \text{ well} = 800 \mu\text{l}$

Volume medium untuk 5 well = (200 - 160) $\mu\text{l/well} \times 5 \text{ well} = 200 \mu\text{l}$

e. D4-31586

Titer virus = $3,5 \times 10^4$ pfu/ml

Jumlah sel = 5×10^5 sel/well

Multiplicity of infection (moi) = 0,01 pfu/sel

Jumlah partikel virus yang diperlukan = Jumlah sel \times moi
 $= 5 \times 10^5 \text{ sel/well} \times 0,01 \text{ pfu/sel}$
 $= 5 \times 10^3 \text{ pfu/well}$

Volume inokulum virus = $\frac{\text{Jumlah partikel virus yang diperlukan}}{\text{Titer virus}}$
 $= \frac{5 \times 10^3 \text{ pfu/well}}{3,5 \times 10^4 \text{ pfu/ml}}$
 $= 1,428 \times 10^{-1} \text{ ml/well}$
 $= 142,8 \mu\text{l/well}$

Volume inokulum total = 200 $\mu\text{l/well}$

Volume inokulum virus untuk 5 well = 142,8 $\mu\text{l/well} \times 5 \text{ well} = 571,2 \mu\text{l}$

Volume medium untuk 5 well = (200 - 142,8) $\mu\text{l/well} \times 5 \text{ well} = 228,8 \mu\text{l}$

f. D4-0252

Titer virus = $7,5 \times 10^6$ pfu/ml

Jumlah sel = 5×10^5 sel/well

Multiplicity of infection (moi) = 0,01 pfu/sel

Jumlah partikel virus yang diperlukan = Jumlah sel \times moi
 $= 5 \times 10^5 \text{ sel/well} \times 0,01 \text{ pfu/sel}$
 $= 5 \times 10^3 \text{ pfu/well}$

Volume inokulum virus = $\frac{\text{Jumlah partikel virus yang diperlukan}}{\text{Titer virus}}$
 $= \frac{5 \times 10^3 \text{ pfu/well}}{7,5 \times 10^6 \text{ pfu/ml}}$
 $= 6,67 \times 10^{-4} \text{ ml/well}$
 $= 0,667 \mu\text{l/well}$

Lanjutan

Stok virus didilusi 200x, maka:

$$M1 \times V1 = M2 \times V2$$

$$7,5 \times 10^6 \text{ pfu/ml} \times 0,667 \text{ } \mu\text{l/well} = 3,75 \times 10^4 \text{ pfu/ml} \times V2$$

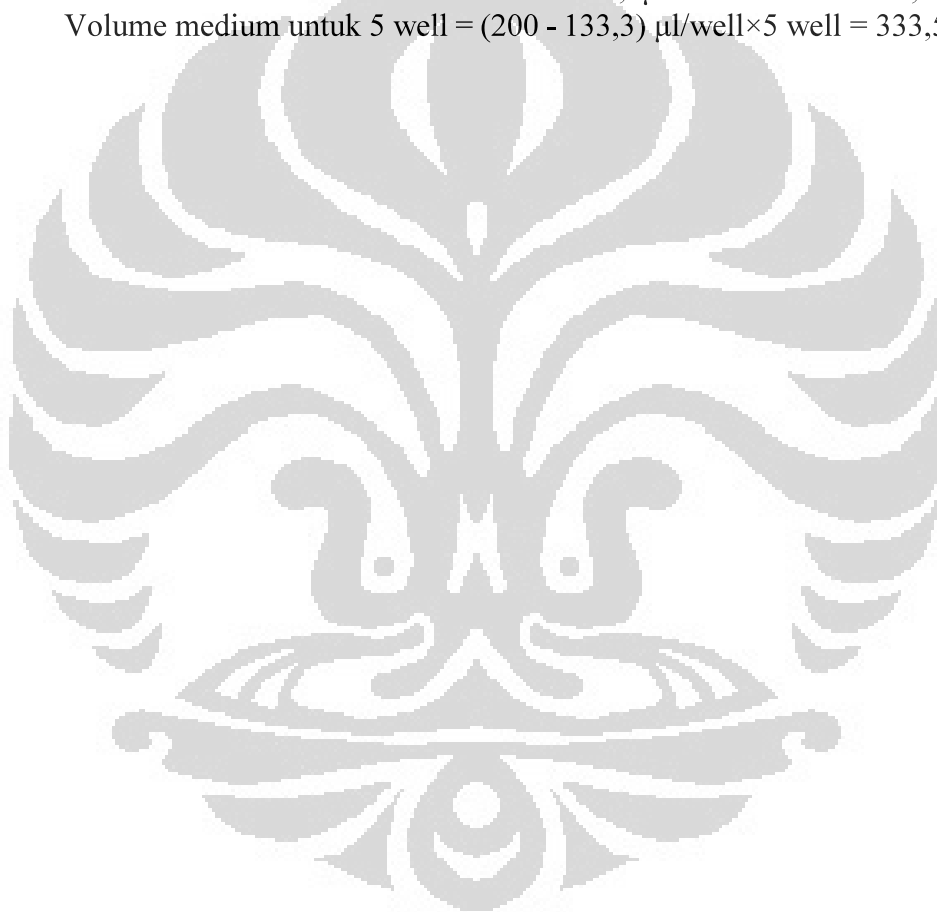
$$V2 = \frac{7,5 \times 10^6 \text{ pfu/ml} \times 0,667 \text{ } \mu\text{l/well}}{3,75 \times 10^4 \text{ pfu/ml}}$$

$$V2 = 133,3 \text{ } \mu\text{l/well}$$

Volume inokulum total = 200 $\mu\text{l/well}$

Volume inokulum virus untuk 5 well = 133,3 $\mu\text{l/well} \times 5 \text{ well} = 666,5 \text{ } \mu\text{l}$

Volume medium untuk 5 well = (200 - 133,3) $\mu\text{l/well} \times 5 \text{ well} = 333,5 \text{ } \mu\text{l}$



Lampiran 8

Tabel data hasil uji *sandwich* ELISA protein NS1 pada sel Vero76

Titik waktu pengambilan sampel (jam)	Nilai OD450			
	D1-Westpac	D2-TSV01	D3-H87	D4-H241
12	0,088	0,104	0,180	0,126
24	0,088	0,195	0,194	0,105
36	0,229	0,524	0,612	0,115
48	0,750	0,958	1,206	0,228
60	4,273	2,520	1,851	0,889
72	4,653	4,464	3,808	4,360

Lampiran 9

Tabel data hasil uji *sandwich* ELISA protein NS1 pada sel A549

Titik waktu pengambilan sampel (jam)	Nilai OD450			
	D1-Westpac	D2-TSV01	D3-H87	D4-H241
12	0,106	0,115	0,169	0,100
24	0,402	0,254	0,618	0,285
36	1,207	1,244	3,585	2,944
48	4,153	3,570	4,471	4,651
60	4,442	4,523	4,487	4,700
72	4,608	4,589	4,697	4,909

Lampiran 10

Hasil uji normalitas Shapiro-Wilk menggunakan SPSS v.17

Tujuan:

Untuk mengetahui normalitas atau kenormalan distribusi data hasil uji pertumbuhan kinetik D1-Westpac, D2-TSV01, D3-H87 dan D4-H241 pada titik waktu 72 jam.

Kriteria:

Jika $p > 0,05$ maka data memiliki distribusi data yang normal.

Jika $p < 0,05$ maka data memiliki distribusi data yang tidak normal.

Hasil:

1. Uji normalitas D1-Westpac

	Galur sel	Shapiro-Wilk		
		Statistic	df	Sig.
D1-Westpac	Enam galur sel	.872	24	.006

Kesimpulan:

Nilai $p = 0,006$ ($p < 0,05$) maka data D1-Westpac memiliki distribusi data yang tidak normal.

2. Uji normalitas D2-TSV01

	Galur sel	Shapiro-Wilk		
		Statistic	df	Sig.
D2-TSV01	Enam galur sel	.872	24	.006

Kesimpulan:

Nilai $p = 0,006$ ($p < 0,05$) maka data D2-TSV01 memiliki distribusi data yang tidak normal.

Lanjutan

3. Uji normalitas D3-H87

	Galur sel	Shapiro-Wilk		
		Statistic	df	Sig.
D3-H87	Enam galur sel	.780	24	.000

Kesimpulan:

Nilai $p = 0,000$ ($p < 0,05$) maka data D3-H87 memiliki distribusi data yang tidak normal.

4. Uji normalitas D4-H241

	Galur sel	Shapiro-Wilk		
		Statistic	df	Sig.
D4-H241	Enam galur sel	.741	24	.000

Kesimpulan:

Nilai $p = 0,000$ ($p < 0,05$) maka data D4-H241 memiliki distribusi data yang tidak normal.

Lampiran 11

Hasil uji statistik non-parametrik Kruskal-Wallis menggunakan SPSS v.17

Tujuan:

Untuk mengetahui ada atau tidaknya perbedaan nyata pada kelompok data hasil uji kinetik D1-Westpac, D2-TSV01, D3-H87 dan D4-H241 pada titik waktu 72 jam.

Kriteria:

Jika $p > 0,05$ maka tidak ada perbedaan nyata antar kelompok data.

Jika $p < 0,05$ maka terdapat perbedaan nyata antar kelompok data.

Hasil:

1. Uji Kruskal-Wallis D1-Westpac

	Galur sel	N	Mean Rank	Statistic	
D1-Westpac	C6/36	4	7.50	Chi-Square	20.963
	Vero76	4	20.75	df	5
	MDCK	4	2.50	Asymp. Sig.	.001
	293	4	19.38		
	HepG2	4	9.50		
	A549	4	15.38		
	Total	24			

2. Uji Kruskal-Wallis D2-TSV01

	Galur sel	N	Mean Rank	Statistic	
D2-TSV01	C6/36	4	22.50	Chi-Square	22.117
	Vero76	4	17.50	df	5
	MDCK	4	4.50	Asymp. Sig.	.000
	293	4	10.50		
	HepG2	4	4.50		
	A549	4	15.50		
	Total	24			

Lanjutan

3. Uji Kruskal-Wallis D3-H87

	Galur sel	N	Mean Rank	Statistic	
D3-H87	C6/36	4	20.88	Chi-Square	21.167
	Vero76	4	13.25	df	5
	MDCK	4	3.50	Asymp. Sig.	.001
	293	4	11.75		
	HepG2	4	5.50		
	A549	4	20.13		
	Total	24			

4. Uji Kruskal-Wallis D4-H241

	Galur sel	N	Mean Rank	Statistic	
D4-H241	C6/36	4	22.50	Chi-Square	22.518
	Vero76	4	16.50	df	5
	MDCK	4	3.00	Asymp. Sig.	.000
	293	4	10.50		
	HepG2	4	6.00		
	A549	4	16.50		
	Total	24			

Kesimpulan:

Hasil uji D1-Westpac, D2-TSV01, D3-H87 dan D4-H241 memiliki nilai $p < 0,05$ maka terdapat perbedaan nyata antar kelompok data.

Lampiran 12
Peta perlakuan dalam eksperimen

	D1	D2	D3	D4
C6/36 (positif)	D1-C6/36	D2-C6/36	D3-C6/36	D4-C6/36
Vero76	D1-Vero76	D2-Vero76	D3-Vero76	D4-Vero76
MDCK	D1-MDCK	D2-MDCK	D3-MDCK	D4-MDCK
293	D1-293	D2-293	D3-293	D4-293
HepG2	D1-HepG2	D2-HepG2	D3-HepG2	D4-HepG2
A549	D1-A549	D2-A549	D3-A549	D4-A549
C6/36 (negatif)	-	-	-	-



Lampiran 13

Tabel data uji kinetik D1-Westpac pada enam galur sel

Sel	Pengulangan	Waktu pasca infeksi (jam)											
		0						12					
		Titer (Pfu/ml)	Log Pfu	Mean Log	Mean	STDEV	Titer (Pfu/ml)	Log Pfu	Mean Log	Mean	STDEV		
D1-C6/36	1	10	1,00	1,00	1,00	0,000	10	1,00	1,00	1,00	0,000		
		10	1,00	1,00	1,00		1,00						
	2	10	1,00	1,00	1,00	0,000	10	1,00	1,00	1,00	0,000		
		10	1,00	1,00	1,00		1,00						
D1-Vero76	1	10	1,00	1,00	1,00	0,000	10	1,00	1,00	1,00	0,000		
		10	1,00	1,00	1,00		1,00						
	2	10	1,00	1,00	1,00	0,000	10	1,00	1,00	1,00	0,000		
		10	1,00	1,00	1,00		1,00						
D1-MDCK	1	10	1,00	1,00	1,00	0,000	10	1,00	1,00	1,00	0,000		
		10	1,00	1,00	1,00		1,00						
	2	10	1,00	1,00	1,00	0,000	10	1,00	1,00	1,00	0,000		
		10	1,00	1,00	1,00		1,00						
D1-293	1	10	1,00	1,00	1,00	0,000	10	1,00	1,00	1,00	0,000		
		10	1,00	1,00	1,00		1,00						
	2	10	1,00	1,00	1,00	0,000	10	1,00	1,00	1,00	0,000		
		10	1,00	1,00	1,00		1,00						
D1-HepG2	1	10	1,00	1,00	1,00	0,000	10	1,00	1,00	1,00	0,000		
		10	1,00	1,00	1,00		1,00						
	2	10	1,00	1,00	1,00	0,000	10	1,00	1,00	1,00	0,000		
		10	1,00	1,00	1,00		1,00						
D1-A549	1	10	1,00	1,00	1,00	0,000	10	1,00	1,00	1,00	0,000		
		10	1,00	1,00	1,00		1,00						
	2	10	1,00	1,00	1,00	0,000	10	1,00	1,00	1,00	0,000		
		10	1,00	1,00	1,00		1,00						
C6/36 (uninfected)	1	0	0,00	0,00	0,00	0,000	0	0,00	0,00	0,00	0,000		
		0	0,00	0,00	0,00		0,00						
	2	0	0,00	0,00	0,00	0,000	0	0,00	0,00	0,00	0,000		
		0	0,00	0,00	0,00		0,00						

Lanjutan

Waktu pasca infeksi (jam)											
24						36					
Titer (Pfu/ml)	Log Pfu	Mean Log	Mean	STDEV	Titer (Pfu/ml)	Log Pfu	Mean Log	Mean	STDEV	Titer (Pfu/ml)	Log Pfu
10	1,00	1,00			350	2,54	2,54			1000	3,00
10	1,00	1,00	1,00	0,000	350	2,54	2,54	2,45	0,138	2000	3,30
10	1,00	1,00			200	2,30	2,30			800	2,90
10	1,00	1,00	1,00	0,000	250	2,40	2,35	2,45	0,138	650	2,81
5000	3,70	3,70	3,42	0,388	20000	4,30	4,35	4,31	0,055	45000	4,65
5000	3,70	3,15			25000	4,40	4,27			50000	4,70
2000	3,30	1,00	1,00	0,000	10000	4,00	1,00	1,00	0,000	20000	4,30
1000	3,00	1,00	1,00	0,000	35000	4,54	1,00	1,00	0,000	35000	4,54
10	1,00	1,00	1,00	0,000	10	1,00	1,00	1,00	0,000	100	2,00
10	1,00	1,00	1,00	0,000	10	1,00	1,00	1,00	0,000	50	1,70
10	1,00	1,00	1,00	0,000	10	1,00	1,00	1,00	0,000	50	1,70
10	1,00	1,00	1,00	0,000	10	1,00	1,00	1,00	0,000	50	1,70
1500	3,18	2,94	2,89	0,062	600	2,78	2,83	2,91	0,123	4000	3,60
500	2,70	2,85			750	2,88	3,00			5000	3,70
1000	3,00	1,00	1,00	0,000	1000	3,00	3,00	2,91	0,123	3500	3,54
500	2,70	1,00	1,00	0,000	1000	3,00	2,24	2,21	0,044	2000	3,30
10	1,00	1,00	1,00	0,000	150	2,18	2,18	2,21	0,044	250	2,40
10	1,00	1,00	1,00	0,000	200	2,30	2,18			100	2,00
10	1,00	1,00	1,00	0,000	150	2,18	2,18	2,21	0,044	100	2,00
10	1,00	1,00	1,00	0,000	150	2,18	2,18	2,21	0,044	600	2,78
5000	3,70	3,70	3,70	0,000	5000	3,70	3,85	3,77	0,106	150000	5,18
5000	3,70	3,70	3,70	0,000	100000	4,00	3,70			1000000	5,00
5000	3,70	3,70	3,70	0,000	5000	3,70	3,70	3,77	0,106	100000	4,00
5000	3,70	3,70	3,70	0,000	5000	3,70	3,70	3,77	0,106	250000	4,40
0	0,00	0,00	0,00	0,000	0	0,00	0,00	0,00	0,000	0	0,00
0	0,00	0,00	0,00	0,000	0	0,00	0,00	0,00	0,000	0	0,00
0	0,00	0,00	0,00	0,000	0	0,00	0,00	0,00	0,000	0	0,00
0	0,00	0,00	0,00	0,000	0	0,00	0,00	0,00	0,000	0	0,00

Lanjutan

Waktu pasca infeksi (jam)																	
48						60						72					
Mean Log	Mean	STDEV	Titer (Pfu/ml)	Log Pfu	Mean Log	Mean	STDEV	Titer (Pfu/ml)	Log Pfu	Mean Log	Mean	STDEV	Titer (Pfu/ml)	Log Pfu	Mean Log	Mean	STDEV
3,15	3,00	0,207	10000	4,00	3,48	3,46	0,018	5000	3,70	3,70	3,70	0,000	5000	3,70	3,70	3,70	0,000
2,86			900	2,95				5000	3,70				5000	3,70			
			10000	4,00	3,45			5000	3,70				5000	3,70			
			800	2,90				5000	3,70				5000	3,70			
4,68	4,55	0,179	200000	6,30	6,35	5,92	0,601	500000	5,70	5,85	5,96	0,155	1000000	6,00	6,07	5,96	0,155
4,42			2500000	6,40				1100000	6,04				1250000	6,10			
			400000	5,60	5,50			1000	3,00				1000	3,00			
			250000	5,40				1000	3,00				500	2,70			
1,85	1,77	0,106	10	1,00	1,35	1,35	0,000	550	2,74	3,00	2,86	0,198	500000	5,70	5,68	5,94	0,370
1,70			50	1,70				1000000	5,00	4,85	4,80	0,064	450000	5,65			
			10	1,00	1,35			2500000	4,78	4,76			2500000	6,40			
			50	1,70				1000000	4,74				1000000	6,00			
3,65	3,54	0,161	50000	4,70	4,85	4,80	0,064	1000000	4,00	4,09	3,89	0,275	450000	5,65	5,76	5,55	0,309
3,42			60000	4,78				750000	3,00	3,00			500000	6,40			
			55000	4,74				300000	3,00				150000	6,00			
2,20	2,29	0,134	1000	3,00	3,00	3,25	0,350	10000	4,00	4,09	3,89	0,275	10000	4,00	4,09	3,89	0,275
			1000	3,00				15000	4,18				5000	4,18			
2,39			1500	3,18	3,49			5000	3,70	3,70			5000	3,70			
			6500	3,81				5000	3,70				5000	3,70			
5,09	4,64	0,629	85000	4,93	4,94	4,82	0,172	450000	5,65	5,76	5,55	0,309	450000	5,65	5,76	5,55	0,309
			90000	4,95				750000	5,88	5,33	5,55	0,309	750000	5,88	5,33	5,55	0,309
4,20			50000	4,70	4,70	4,82	0,172	300000	4,70	4,70	4,82	0,172	300000	5,48	5,33	5,55	0,309
			50000	4,70				150000	4,70				150000	5,18			
0,00	0,00	0,000	0	0,00	0,00	0,00	0,000	0	0,00	0,00	0,00	0,000	0	0,00	0,00	0,00	0,000
			0	0,00				0	0,00				0	0,00			
0,00	0,00	0,000	0	0,00	0,00	0,00	0,000	0	0,00	0,00	0,00	0,000	0	0,00	0,00	0,00	0,000
			0	0,00				0	0,00				0	0,00			

Lampiran 14

Tabel data uji kinetik D2-TSV01 pada enam galur sel

Sel	Pengulangan	Waktu pasca infeksi (jam)														
		0						12								
		Titer (Pfu/ml)	Log Pfu	Mean Log	Mean	STDEV	Titer (Pfu/ml)	Log Pfu	Mean Log	Mean	STDEV	Titer (Pfu/ml)	Log Pfu	Mean Log	Mean	STDEV
D2-C6/36	1	10	1,00	1,00	1,00	0,000	10	1,00	1,00	1,00	0,000	10	1,00	1,00	1,00	0,000
	2	10	1,00	1,00	1,00	0,000	10	1,00	1,00	1,00	0,000	10	1,00	1,00	1,00	0,000
D2-Vero76	1	10	1,00	1,00	1,00	0,000	10	1,00	1,00	1,00	0,000	10	1,00	1,00	1,00	0,000
	2	10	1,00	1,00	1,00	0,000	10	1,00	1,00	1,00	0,000	10	1,00	1,00	1,00	0,000
D2-MDCK	1	10	1,00	1,00	1,00	0,000	10	1,00	1,00	1,00	0,000	10	1,00	1,00	1,00	0,000
	2	10	1,00	1,00	1,00	0,000	10	1,00	1,00	1,00	0,000	10	1,00	1,00	1,00	0,000
D2-293	1	10	1,00	1,00	1,00	0,000	10	1,00	1,00	1,00	0,000	10	1,00	1,00	1,00	0,000
	2	10	1,00	1,00	1,00	0,000	10	1,00	1,00	1,00	0,000	10	1,00	1,00	1,00	0,000
D2-HepG2	1	10	1,00	1,00	1,00	0,000	10	1,00	1,00	1,00	0,000	10	1,00	1,00	1,00	0,000
	2	10	1,00	1,00	1,00	0,000	10	1,00	1,00	1,00	0,000	10	1,00	1,00	1,00	0,000
D2-A549	1	10	1,00	1,00	1,00	0,000	10	1,00	1,00	1,00	0,000	10	1,00	1,00	1,00	0,000
	2	10	1,00	1,00	1,00	0,000	10	1,00	1,00	1,00	0,000	10	1,00	1,00	1,00	0,000
C6/36 (uninfected)	1	0	0,00	0,00	0,00	0,000	0	0,00	0,00	0,00	0,000	0	0,00	0,00	0,00	0,000
	2	0	0,00	0,00	0,00	0,000	0	0,00	0,00	0,00	0,000	0	0,00	0,00	0,00	0,000

Lanjutan

Waktu pasca infeksi (jam)																	
24						36						48					
Titer (Pfu/ml)	Log Pfu	Mean Log	Mean	STDEV	Titer (Pfu/ml)	Log Pfu	Mean Log	Mean	STDEV	Titer (Pfu/ml)	Log Pfu	Mean Log	Mean	STDEV	Titer (Pfu/ml)	Log Pfu	
4000	3,60	3,63	3,61	0,021	9000	3,95	4,04	4,01	0,047	60000	4,78	2,70	2,77	0,106	500	2,70	
4500	3,65	3,60			13500	4,13	35000			4,54							
4500	3,65	3,60			8500	3,93	50000			4,70							
3500	3,54	3,60			10500	4,02	40000			4,60							
50	1,70	1,70	1,89	0,275	500	2,70	2,70	500	2,70	1000	3,00	2,74	2,74	500	2,70		
50	1,70	2,09	1,00	0,000	500	2,70	2,85	1000	3,00	10	1,00	1,00	1,00	10	1,00		
100	2,00	2,09	1,00	0,000	10	1,00	1,00	10	1,00	10	1,00	1,00	1,00	10	1,00		
150	2,18	2,09	1,00	0,000	10	1,00	1,00	10	1,00	10	1,00	1,00	1,00	10	1,00		
10	1,00	1,00	1,00	0,000	10	1,00	1,00	10	1,00	10	1,00	1,00	1,00	10	1,00		
10	1,00	1,00	1,00	0,000	10	1,00	1,00	10	1,00	10	1,00	1,00	1,00	10	1,00		
10	1,00	1,00	1,00	0,000	10	1,00	1,00	10	1,00	10	1,00	1,00	1,00	10	1,00		
10	1,00	1,00	1,00	0,000	10	1,00	1,00	10	1,00	10	1,00	1,00	1,00	10	1,00		
10	1,00	1,00	1,00	0,000	10	1,00	1,00	10	1,00	10	1,00	1,00	1,00	10	1,00		
10	1,00	1,00	1,00	0,000	10	1,00	1,00	10	1,00	10	1,00	1,00	1,00	10	1,00		
150	2,18	2,29	2,31	0,028	500	2,70	2,70	2,97	0,382	2000	3,30	3,24	2,97	2000	3,30		
250	2,40	2,33	0,00	0,000	500	2,70	2,70	0,00	0,000	1500	3,18	0,00	0,00	1500	3,18		
150	2,18	2,33	0,00	0,000	2000	3,30	3,24	0,00	0,000	2000	3,30	3,30	0,00	2000	3,30		
300	2,48	2,33	0,00	0,000	1500	3,18	3,24	0,00	0,000	500	2,70	2,70	0,00	500	2,70		
0	0,00	0,00	0,00	0,000	0	0,00	0,00	0,00	0,000	0	0,00	0,00	0,00	0	0,00		
0	0,00	0,00	0,00	0,000	0	0,00	0,00	0,00	0,000	0	0,00	0,00	0,00	0	0,00		
0	0,00	0,00	0,00	0,000	0	0,00	0,00	0,00	0,000	0	0,00	0,00	0,00	0	0,00		
0	0,00	0,00	0,00	0,000	0	0,00	0,00	0,00	0,000	0	0,00	0,00	0,00	0	0,00		

Lanjutan

Waktu pasca infeksi (jam)												
60						72						
Mean Log	Mean	STDEV	Titer (Pfu/ml)	Log Pfu	Mean Log	Mean	STDEV	Titer (Pfu/ml)	Log Pfu	Mean Log	Mean	STDEV
4,66	4,66	0,007	50000	4,70	5,05	5,10	0,072	350000	5,54	5,42	5,12	0,425
4,65			250000	5,40				200000	5,30			
			100000	5,00	5,15			55000	4,74	4,82		
			200000	5,30				80000	4,90			
2,85			4000	3,60	3,60			5000	3,70	4,09		
			4000	3,60		3,73	0,175	30000	4,48		4,09	0,000
2,78	2,81	0,052	5000	3,70	3,85			15000	4,18			
			10000	4,00				10000	4,00			
1,00	1,00	0,000	10	1,00	1,00			10	1,00	1,00		
			10	1,00		1,00	0,000	10	1,00			
1,00	1,00	0,000	10	1,00	1,00			10	1,00	1,00		0,000
			10	1,00				10	1,00			
1,35	1,35	0,000	50	1,70	2,05	2,12	0,106	250	2,40	2,55	2,45	0,141
			250	2,40				500	2,70			
1,35			100	2,00	2,20			100	2,00	2,35		
			250	2,40				500	2,70			
1,00	1,00	0,000	10	1,00	1,00			10	1,00	1,00		
			10	1,00		1,00	0,000	10	1,00			
1,00	1,00	0,000	10	1,00	1,00			10	1,00	1,00		0,000
			10	1,00				10	1,00			
3,24	3,12	0,169	8500	3,93	3,92	3,78	0,188	7000	3,85	3,85	3,81	0,047
			8000	3,90				7000	3,85			
3,00			4000	3,60	3,65			6000	3,78	3,78		
			5000	3,70				6000	3,78			
0,00	0,00	0,000	0	0,00	0,00	0,00	0,000	0	0,00	0,00	0,00	0,000
			0	0,00				0	0,00			
0,00	0,00	0,000	0	0,00	0,00			0	0,00	0,00		
			0	0,00				0	0,00			

Lampiran 15

Tabel data uji kinetik D3-H87 pada enam galur sel

Sel	Pengulangan	Waktu pasca infeksi (jam)											
		0						12					
		Titer (Pfu/ml)	Log Pfu	Mean Log	Mean	STDEV	Titer (Pfu/ml)	Log Pfu	Mean Log	Mean	STDEV		
D3-C6/36	1	10	1,00	1,00	1,00	0,000	10	1,00	1,00	1,00	0,000		
		10	1,00	1,00	1,00		10	1,00	1,00	1,00			
	2	10	1,00	1,00	1,00	0,000	10	1,00	1,00	1,00	0,000		
		10	1,00	1,00	1,00		10	1,00	1,00	1,00			
D3-Vero76	1	10	1,00	1,00	1,00	0,000	10	1,00	1,00	1,00	0,000		
		10	1,00	1,00	1,00		10	1,00	1,00	1,00			
	2	10	1,00	1,00	1,00	0,000	10	1,00	1,00	1,00	0,000		
		10	1,00	1,00	1,00		10	1,00	1,00	1,00			
D3-MDCK	1	10	1,00	1,00	1,00	0,000	10	1,00	1,00	1,00	0,000		
		10	1,00	1,00	1,00		10	1,00	1,00	1,00			
	2	10	1,00	1,00	1,00	0,000	10	1,00	1,00	1,00	0,000		
		10	1,00	1,00	1,00		10	1,00	1,00	1,00			
D3-293	1	10	1,00	1,00	1,00	0,000	10	1,00	1,00	1,00	0,000		
		10	1,00	1,00	1,00		10	1,00	1,00	1,00			
	2	10	1,00	1,00	1,00	0,000	10	1,00	1,00	1,00	0,000		
		10	1,00	1,00	1,00		10	1,00	1,00	1,00			
D3-HepG2	1	10	1,00	1,00	1,00	0,000	10	1,00	1,00	1,00	0,000		
		10	1,00	1,00	1,00		10	1,00	1,00	1,00			
	2	10	1,00	1,00	1,00	0,000	10	1,00	1,00	1,00	0,000		
		10	1,00	1,00	1,00		10	1,00	1,00	1,00			
D3-A549	1	10	1,00	1,00	1,00	0,000	10	1,00	1,00	1,00	0,000		
		10	1,00	1,00	1,00		10	1,00	1,00	1,00			
	2	10	1,00	1,00	1,00	0,000	10	1,00	1,00	1,00	0,000		
		10	1,00	1,00	1,00		10	1,00	1,00	1,00			
C6/36 (uninfected)	1	0	0,00	0,00	0,00	0,000	0	0,00	0,00	0,00	0,000		
		0	0,00	0,00	0,00		0	0,00	0,00	0,00			
	2	0	0,00	0,00	0,00	0,000	0	0,00	0,00	0,00	0,000		
		0	0,00	0,00	0,00		0	0,00	0,00	0,00			

Lanjutan

Waktu pasca infeksi (jam)													
24						36						48	
Titer (Pfu/ml)	Log Pfu	Mean Log	Mean	STDEV	Titer (Pfu/ml)	Log Pfu	Mean Log	Mean	STDEV	Titer (Pfu/ml)	Log Pfu		
550	2,74	2,74	2,72	0,031	5000	3,70	3,72	3,70	0,029	15000	4,18		
550	2,74	2,74			5500	3,74				15000	4,18		
550	2,74	2,70			6500	3,81	3,68	3,70		10000	4,00		
450	2,65				3500	3,54				25000	4,40		
100	2,00	1,85	1,97	0,169	1000	3,00	2,85	2,79	0,078	500	2,70		
50	1,70				500	2,70				1000	3,00		
150	2,18	2,09			500	2,70	2,74			1500	3,18		
100	2,00				600	2,78				1500	3,18		
10	1,00	1,00	1,00	0,000	10	1,00	1,00	1,00		10	1,00		
10	1,00				10	1,00				10	1,00		
10	1,00	1,00	1,00	0,000	10	1,00	1,00	1,00	0,000	10	1,00		
10	1,00				10	1,00				10	1,00		
250	2,40	2,29	2,26	0,034	500	2,70	2,70	2,70	0,000	1500	3,18		
150	2,18				500	2,70				2500	3,40		
200	2,30	2,24			500	2,70	2,70	2,70		1500	3,18		
150	2,18				500	2,70				1500	3,18		
10	1,00	1,00	1,00	0,000	10	1,00	1,00	1,00		10	1,00		
10	1,00				10	1,00				10	1,00		
10	1,00	1,00	1,00	0,000	10	1,00	1,00	1,00	0,000	10	1,00		
10	1,00				10	1,00				10	1,00		
2500	3,40	3,44	3,32	0,169	10000	4,00	3,85	3,77	0,106	25000	4,40		
3000	3,48				5000	3,70				30000	4,48		
2500	3,40	3,20			5000	3,70	3,70			45000	4,65		
1000	3,00				5000	3,70				30000	4,48		
0	0,00	0,00	0,00	0,000	0	0,00	0,00	0,00	0,000	0	0,00		
0	0,00				0	0,00				0	0,00		
0	0,00	0,00	0,00	0,000	0	0,00	0,00	0,00	0,000	0	0,00		
0	0,00				0	0,00				0	0,00		

Lanjutan

Waktu pasca infeksi (jam)													
60							72						
Mean Log	Mean	STDEV	Titer (Pfu/ml)	Log Pfu	Mean Log	Mean	STDEV	Titer (Pfu/ml)	Log Pfu	Mean Log	Mean	STDEV	STDEV
4,18	4,19	0,016	40000	4,60	4,50	4,44	0,078	30000	4,48	4,44	4,49	0,072	
			25000	4,40				25000	4,40				
4,20			20000	4,30	4,39			30000	4,48	4,54			
			30000	4,48	40000			4,60					
2,85	3,01	0,231	2000	3,30	3,30	3,50	0,281	5000	3,70	3,85	3,85	0,000	
			2000	3,30	10000			4,00					
3,18			5000	3,70	3,70			5000	3,70	3,85			
			5000	3,70	10000			4,00					
1,00	1,00	0,000	10	1,00	1,00	1,00	0,000	10	1,00	1,00	1,00	0,000	
			10	1,00	10			1,00					
1,00			10	1,00	1,00			10	1,00	1,00			
			10	1,00	10			1,00					
3,29	3,23	0,078	2000	3,30	3,48	3,41	0,090	2500	3,40	3,57	3,64	0,106	
			4500	3,65	5500			3,74					
3,18			2000	3,30	3,35			5500	3,74	3,72			
			2500	3,40	5000			3,70					
1,00	1,00	0,000	10	1,00	1,00	1,00	0,000	10	1,00	1,35	1,35	0,000	
			10	1,00	50			1,70					
1,00			10	1,00	1,00			10	1,00	1,35			
			10	1,00	50			1,70					
4,44	4,50	0,090	35000	4,54	4,51	4,60	0,133	40000	4,60	4,45	4,44	0,021	
			30000	4,48	20000			4,30					
4,57			50000	4,70	4,70			20000	4,30	4,42			
			50000	4,70	35000			4,54					
0,00	0,00	0,000	0	0,00	0,00	0,00	0,000	0	0,00	0,00	0,00	0,000	
			0	0,00	0			0,00					
0,00			0	0,00	0,00			0	0,00	0,00			
			0	0,00	0			0,00					

Lampiran 16

Tabel data uji kinetik D4-H241 pada enam galur sel

Sel	Pengulangan	Waktu pasca infeksi (jam)													
		0						12							
		Titer (Pfu/ml)	Log Pfu	Mean Log	Mean	STDEV	Titer (Pfu/ml)	Log Pfu	Mean Log	Mean	STDEV	Log Pfu	Mean Log	Mean	STDEV
D4-C6/36	1	10	1,00	1,00	1,00	0,0000	10	1,00	1,00	1,00	0,0000	1,00	1,00	1,00	0,0000
	2	10	1,00	1,00	1,00	0,0000	10	1,00	1,00	1,00	0,0000	1,00	1,00	1,00	0,0000
D4-Vero76	1	10	1,00	1,00	1,00	0,0000	10	1,00	1,00	1,00	0,0000	1,00	1,00	1,00	0,0000
	2	10	1,00	1,00	1,00	0,0000	10	1,00	1,00	1,00	0,0000	1,00	1,00	1,00	0,0000
D4-MDCK	1	10	1,00	1,00	1,00	0,0000	10	1,00	1,00	1,00	0,0000	1,00	1,00	1,00	0,0000
	2	10	1,00	1,00	1,00	0,0000	10	1,00	1,00	1,00	0,0000	1,00	1,00	1,00	0,0000
D4-293	1	10	1,00	1,00	1,00	0,0000	10	1,00	1,00	1,00	0,0000	1,00	1,00	1,00	0,0000
	2	10	1,00	1,00	1,00	0,0000	10	1,00	1,00	1,00	0,0000	1,00	1,00	1,00	0,0000
D4-HepG2	1	10	1,00	1,00	1,00	0,0000	10	1,00	1,00	1,00	0,0000	1,00	1,00	1,00	0,0000
	2	10	1,00	1,00	1,00	0,0000	10	1,00	1,00	1,00	0,0000	1,00	1,00	1,00	0,0000
D4-A549	1	10	1,00	1,00	1,00	0,0000	100	2,00	2,00	1,00	0,0000	2,00	2,00	2,09	0,125
	2	10	1,00	1,00	1,00	0,0000	150	2,18	2,18	1,00	0,0000	2,18	2,18	2,09	0,125
C6/36 (uninfected)	1	0	0,00	0,00	0,00	0,0000	0	0,00	0,00	0,00	0,0000	0,00	0,00	0,00	0,0000
	2	0	0,00	0,00	0,00	0,0000	0	0,00	0,00	0,00	0,0000	0,00	0,00	0,00	0,0000

Lanjutan

Waktu pasca infeksi (jam)													
24						36						48	
Titer (Pfu/ml)	Log Pfu	Mean Log	Mean	STDEV	Titer (Pfu/ml)	Log Pfu	Mean Log	Mean	STDEV	Titer (Pfu/ml)	Log Pfu		
50	1,70	1,70			500	2,70	2,62			1500	3,18		
50	1,70		1,70	0,000	350	2,54		2,58	0,055	2000	3,30		
50	1,70	1,70			350	2,54	2,54			2500	3,40		
50	1,70		1,70		350	2,54				2500	3,40		
350	2,54	2,60			1000	3,00	3,00			3000	3,48		
450	2,65		2,52	0,114	1000	3,00		3,00	0,000	5000	3,70		
250	2,40	2,44			2000	3,30	3,00			2500	3,40		
300	2,48				500	2,70		3,00		1000	3,00		
10	1,00	1,00	1,00		10	1,00	1,00			10	1,00		
10	1,00		1,00	0,000	10	1,00		1,00	0,000	10	1,00		
10	1,00	1,00			10	1,00	1,00			10	1,00		
10	1,00		1,00		10	1,00		1,00		10	1,00		
500	2,70	2,94			500	2,70	2,85			10000	4,00		
1500	3,18		2,82	0,169	1000	3,00		2,85	0,000	10000	4,00		
500	2,70	2,70			1000	3,00	2,85			15000	4,18		
500	2,70				500	2,70				15000	4,18		
10	1,00	1,00	1,00		10	1,00	1,00			50	1,70		
10	1,00		1,00	0,000	10	1,00		1,00	0,000	10	1,00		
10	1,00	1,00			10	1,00	1,00			50	1,70		
10	1,00		1,00		10	1,00		1,00		10	1,00		
3000	3,48	3,44			3500	3,54	3,47			4000	3,60		
2500	3,40		3,39	0,062	2500	3,40		3,43	0,052	5500	3,74		
2000	3,30	3,35			2500	3,40	3,40			5000	3,70		
2500	3,40				2500	3,40				5500	3,74		
0	0,00	0,00	0,00		0	0,00	0,00			0	0,00		
0	0,00		0,00	0,000	0	0,00		0,00	0,000	0	0,00		
0	0,00	0,00			0	0,00	0,00			0	0,00		
0	0,00		0,00		0	0,00		0,00		0	0,00		

Lanjutan

Waktu pasca infeksi (jam)													
60							72						
Mean Log	Mean	STDEV	Titer (Pfu/ml)	Log Pfu	Mean Log	Mean	STDEV	Titer (Pfu/ml)	Log Pfu	Mean Log	Mean	STDEV	STDEV
3,24	3,32	0,113	20000	4,30	4,39	4,24	0,213	85000	4,93	4,94	4,97	0,041	
			30000	4,48				90000	4,95				
3,40	3,39	0,275	10000	4,00	4,09	4,47	0,209	100000	5,00	5,00	4,70	0,000	
			15000	4,18				100000	5,00				
3,59	3,39	0,275	30000	4,48	4,33	4,47	0,209	50000	4,70	4,70	4,70	0,000	
			15000	4,18				50000	4,70				
3,20	1,00	0,000	35000	4,54	4,62	1,00	0,000	50000	4,70	4,70	1,00	0,000	
			50000	4,70				50000	4,70				
1,00	1,00	0,000	10	1,00	1,00	1,00	0,000	10	1,00	1,00	1,00	0,000	
			10	1,00				10	1,00				
1,00	1,00	0,000	10	1,00	1,00	1,00	0,000	10	1,00	1,00	1,00	0,000	
			10	1,00				10	1,00				
4,00	4,09	0,125	10000	4,00	4,15	4,19	0,062	10000	4,00	4,01	4,12	0,161	
			20000	4,30				10500	4,02				
4,18	1,35	0,000	15000	4,18	4,24	1,52	0,247	20000	4,30	4,24	1,60	0,141	
			20000	4,30				15000	4,18				
1,35	1,35	0,000	10	1,00	1,35	1,52	0,247	50	1,70	1,70	1,60	0,141	
			50	1,70				50	1,70				
1,35	1,35	0,000	50	1,70	1,70	1,52	0,247	100	2,00	1,50	1,60	0,141	
			50	1,70				10	1,00				
3,67	3,70	0,034	20000	4,30	4,30	4,15	0,213	50000	4,70	4,70	4,70	0,000	
			20000	4,30				50000	4,70				
3,72	0,00	0,000	10000	4,00	4,00	0,00	0,000	50000	4,70	4,70	0,00	0,000	
			10000	4,00				50000	4,70				
0,00	0,00	0,000	0	0,00	0,00	0,00	0,000	0	0,00	0,00	0,00	0,000	
			0	0,00				0	0,00				
0,00	0,00	0,000	0	0,00	0,00	0,00	0,000	0	0,00	0,00	0,00	0,000	
			0	0,00				0	0,00				