

Deteksi Virus Dengue Tipe 2 dengan Cara Hibridisasi *in situ* (Detection of Type 2 Dengue Virus by *in situ* Hybridization)

MAKSUM RADJI, AMIN SOEBANDRIO*, MIRAWATI SUDIRO & PRATIWI SUDARMONO

*Bagian Mikrobiologi FKUI, Jln. Pegangsaan Timur No. 16, Jakarta 10320
Tel. 062-021-3100806, Faks. 062-021-3100810, Email: amin0207@rad.net.id*

ABSTRACT

Demonstration of dengue virus (DV) in infected cell would enable elaboration of pathogenesis and pathophysiology of dengue Fever and dengue Haemorrhagic Fever. Molecular detection of DV would give high sensitivity as well as specificity. C6/36 mosquito cell line artificially infected with DV was used as a model of DV infected cell. 290-bp cDNA of envelope region of DV type 2 (DV-2) labeled with digoxigenin-11-dUTP was used as probe. Hybridization was performed directly to infected cell fixed on to glass slide (*in situ*). 10 ng/ul of the probe was able to detect as low as 10x TCID₅₀ infecting DV-2. The signal produced was not found in negative control and was clearly increasing in infecting viral dose dependent manner. There was no cross reactivity between DV-2 probe and DV-3 and *vice versa*. The DV-2 probe was sensitive yet specific in demonstrating the presence of Dv-2 in infected cell.

Key word: hybridization, digoxigenin (DIG), pathogenesis

Sampai saat ini penyakit demam berdarah dengue masih merupakan masalah utama dalam bidang kesehatan masyarakat, khususnya di daerah tropik termasuk Indonesia (Gubler 1991).

Sejak kasus demam berdarah dengue pertama kali dilaporkan pada tahun 1968 di Indonesia (Partana 1970), angka kejadiannya semakin meningkat dan penyebarannya semakin meluas sehingga sampai dengan tahun 1992 seluruh provinsi di Indonesia telah melaporkan berjangkitnya demam berdarah dengue, kecuali Timor Timur (Suroso 1993). Angka kematian demam berdarah dengue yang tidak mendapatkan perawatan segera mencapai 50%, akan tetapi angka tersebut dapat diturunkan sampai 5% jika tindakan cepat dan tepat segera dilaksanakan (Suroso 1991).

Mengingat bahwa gambaran klinis akibat infeksi virus dengue amat bervariasi dan jarang yang memperlihatkan gejala klinis yang khas (Poerwosoedarmo 1983, Agus 1988) maka cara diagnosis konfirmasi mikrobiologi yang tepat amat penting dalam menunjang diagnosis demam berdarah dengue, baik untuk pengelolaan kasus maupun untuk pengendalian dan pemberantasan penyakit.

Cara diagnosis laboratorium demam berdarah dengue pada dasarnya dilakukan dengan cara mengidentifikasi virus dengue setelah diisolasi dari tubuh penderita dan cara serodiagnosis yaitu mendeteksi adanya antibodi spesifik terhadap virus dengue dalam serum penderita (WHO 1975).

Deteksi virus dengue dengan cara isolasi dan identifikasi merupakan "standar emas" dalam diagnosis laboratorium virus dengue, tetapi cara ini rumit dan memerlukan waktu pemeriksaan yang cukup lama yaitu sekitar 1-2 minggu. Uji hambatan hemaglutinasi merupakan cara serodiagnosis yang paling banyak digunakan dan dianjurkan penggunaannya oleh WHO mempunyai beberapa

kelemahan sehingga tidak dapat digunakan untuk pengelolaan penderita (Agus 1993, Soebandrio 1988).

Penggunaan teknik hibridisasi dan amplifikasi asam nukleat untuk mendeteksi virus dengue dalam sel yang terinfeksi telah dikembangkan oleh beberapa peneliti (Henchal *et al.* 1987, Khan & Wright 1987, Olson *et al.* 1988). Deubel *et al.* (1990) telah berhasil mengkonstruksi pelacak cDNA yang berasal fragmen gen E virus dengue yang spesifik terhadap setiap tipe virus dengue (Deubel 1990).

Hasil penelitian tentang penggunaan pelacak cDNA yang berasal dari fragmen gen E virus dengue tipe 2 yang dilabel dengan bahan nirradioaktif untuk mendeteksi virus dengue tipe 2 dalam biakan sel C6/36 yang terinfeksi dijelaskan.

BAHAN DAN METODE

Virus. Virus dengue yang digunakan dalam penelitian ini adalah virus dengue tipe 2 galur New Guinea C. Virus diperbanyak dalam biakan sel *Aedes albopictus* klon C6/36. Titer infektivitas virus terhadap biakan sel 50% (TCID₅₀) ditentukan menurut rumus Reed Muench (Schmidt 1979).

Penyiapan Biakan Sel c6/36 Terinfeksi Virus Dengue Tipe 2. Sel C6/36 dibiakkan di atas kaca obyek yang telah diorganosilasi (Dako Corp) dalam media *Eagle's Minimum Essential Medium* (NEM) yang mengandung 10% serum anak sapi dan ditempatkan di dalam cawan Petri. Virus dengue tipe 2 diinokulasikan pada biakan selapis sel C6/36 dengan dosis 10, 100, dan 1000 TCID₅₀ dan selanjutnya diinkubasi pada suhu kamar selama dua hari. Setelah itu gelas alas dicuci beberapa kali dengan larutan *phosphate buffer saline* (PBS) dan disimpan dalam etanol absolut pada suhu 4°C.

*Penulis untuk korespondensi

Penyiapan Pelacak cDNA. Plasmid rekombinan pKS-DEN2 yang mengandung cDNA yang komplementer terhadap fragmen RNA dalam gen E virus dengue tipe 2 berasal dari V. Deubel, Institut Pasteur Perancis. Plasmid ditransformasikan ke dalam bakteri *Escherichia coli* galur DH5, kemudian sel *E. coli* DH5 yang mengandung plasmid pKS-DEN2 dibiakkan dalam media Luria Bertani dengan teknik preparasi skala besar. Isolasi plasmid DNA dan purifikasinya dengan teknik ultra sentrifugasi gradien sesium klorida-etidium bromida dilakukan menurut metode standar (Sambrook *et al.* 1989).

Pemotongan plasmid DNA dengan enzim endonuklease restriksi *Bam*HI dan *Hinc* II (Pharmacia) untuk mendapatkan fragmen DNA yang akan dijadikan pelacak dilakukan menurut petunjuk yang diberikan oleh pabriknya, kemudian dilakukan elektroforesis menggunakan agarose 1.5% (Dojindo Laboratories) dengan larutan penyangga Tris-asetat 40 mM dan EDTA 1 mM (TAE). Fragmen restriksi tersebut kemudian dielektroelusi dan dimurnikan (Sambrook 1989).

Penandaan Pelacak cDNA. Fragmen restriksi *Bam*HI dan *Hinc* II yang telah dimurnikan ditandai dengan bahan nirradioaktif yaitu dengan digoksinen-11-dUTP dengan teknik "random priming" menggunakan kit khusus sesuai dengan petunjuk yang dianjurkan oleh pabrik yang memproduksinya (Boehringer 1989).

Hibridisasi *in situ*. Sel C6/36 yang telah terinfeksi dengan virus dengue tipe 2 dihidrasi berturut-turut di dalam etanol 70, 50, dan 30%, masing-masing selama 5 menit dan dicuci dengan PBS yang mengandung 5 mM MgCl₂ selama 10 menit pada suhu kamar. Setelah sel diinkubasi dalam HCl 0.2 N dan dicuci dengan larutan sitrat salin (SSC 2X) yang mengandung 5 mM EDTA, sel dipaparkan dengan enzim proteinase K 2 µg/ml (Boehringer Mannheim) selama 15 menit pada suhu 37°C, kemudian dicuci dengan larutan glisina 0.2% selama 10 menit pada suhu kamar. Setelah itu sel difiksasi dengan larutan paraformaldehida 4% selama 30 menit dan dicuci dengan larutan PBS yang mengandung MgCl₂ selama 15 menit pada suhu kamar. Sel C6/36 yang telah difiksasi tersebut diinkubasi selama 15 menit pada suhu 42°C dalam larutan prahibridisasi yang terdiri atas larutan sitrat salin (SSC 6X), formamid 45%, larutan Denhart's 5X, dan DNA sperma salmon 100 µg/ml (Boehringer Mannheim).

Hibridisasi sel dengan larutan hibridisasi yang terdiri atas larutan SSC 6X, formamid 45%, larutan Denhardt's 5X, dektran sulfat 10% dan pelacak DNA tertandai digoksinen 5 ng/20 ul dilakukan di bawah kaca penutup yang telah disilikonisasi dan diinkubasi pada suhu 42°C selama satu malam. Setelah itu sel dicuci berturut-turut dengan larutan SSC 6X mengandung formamid 45% pada suhu 42°C sebanyak dua kali, SSC 2X pada suhu kamar sebanyak dua kali, dan dengan SSC 0.2X pada suhu 50°C sebanyak dua kali, masing-masing selama 15 menit.

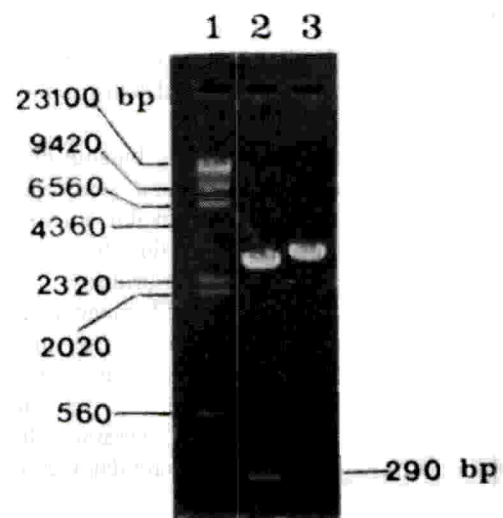
Deteksi hibrid pelacak cDNA dengan RNA sasaran dilakukan menurut cara baku yang lazim dilakukan untuk sistem penandaan pelacak DNA dengan digoksinen (Boehringer Mannheim 1989).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Preparasi Pelacak cDNA. Untuk mendapatkan jumlah pelacak cDNA yang memadai supaya dapat digunakan untuk melacak virus dengue tipe 2, langkah pertama yang dilakukan ialah mentransformasikan plasmid pKS-DEN2 yang mengandung fragmen gen E yang spesifik terhadap virus dengue tipe 2 ke dalam *E. coli* DH5. Hasil transformasi yang menggunakan teknik *heat shock treatment* (Sambrook *et al.* 1989) yaitu 9.7x10⁶ transforman/µg plasmid. Hasil ini cukup memadai untuk melakukan amplifikasi lebih lanjut.

Dengan teknik preparasi skala besar didapatkan 210 µg plasmid DNA dari 500 ml biakan *E. coli* DH5 yang telah ditransformasi. Ukuran molekul plasmid pKS-DEN2 berdasarkan hasil elektroforesisnya dalam gel agarose 1.5% sebanyak 3,220 pasangan basa.

Pemotongan plasmid pKS-DEN2 dengan enzim *Bam*HI dan *Hinc* II menghasilkan fragmen DNA yang akan dijadikan pelacak sebanyak 290 pasangan basa (Gambar 1).

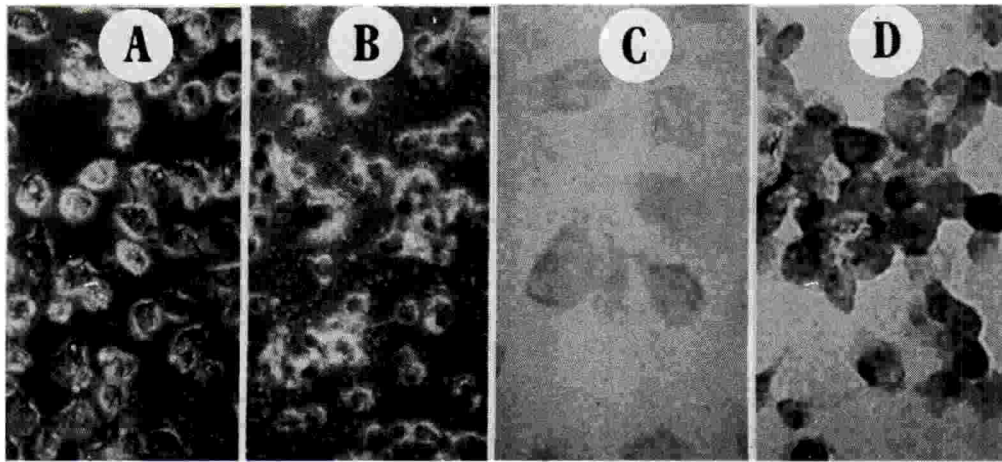


Gambar 1. Hasil pemotongan plasmid pKS-DEN2 dengan enzim *Bam*HI dan *Hinc* II. Lajur 1: penanda ukuran (λ DNA/*Hinc* II), 2: pKS-DEN2 dipotong dengan *Bam*HI dan *Hinc* II, 3: pKS-DEN2 utuh.

Fragmen restriksi sebanyak 290 pasangan basa tersebut diisolasi dari gel agarose dengan cara elektroelusi dalam tabung dialisis dan ditandai dengan digoksinen-11-dUTP. Efisiensi penandaan pelacak DNA dengan teknik *random priming* ini cukup memadai. Dari 1 µg/ul plasmid pKS-DEN2 yang telah dipotong dengan enzim *Bam*HI dan *Hinc* II dipurifikasi dihasilkan kadar pelacak DNA yang terlabel sekitar 10 ng/ul.

Hibridisasi *in situ*. Sel C6/36 yang telah terinfeksi dengan virus dengue tipe 2 dan telah difiksasi di atas kaca obyek dihibridisasi dengan pelacak DNA yang telah ditandai dengan digoksinen (Gambar 2).

Dari penelitian ini didapatkan bahwa pelacak DNA dengan kadar 5 ng/20 ul larutan hibridisasi dapat



Gambar 2. Hasil hibridisasi *in situ* virus dengue tipe 2. A: Kontrol (sel C6/36), perbesaran 400x; B: Sel C6/36 terinfeksi DEN2 100 TCID₅₀, (400x); C: Kontrol (sel C6/36), perbesaran 1000x; D: Sel C6/36 terinfeksi DEN2 1000 TCID₅₀, (1000x).

mengeteksi dengan baik virus dengue tipe 2 pada sel C6/36 yang terinfeksi dengan 10 TCID₅₀, 100 TCID₅₀, dan 1000 TCID₅₀ setelah dua hari infeksi. Kerusakan sel C6/36 terlihat pada sel C6/36 yang diinfeksi dengan 1000 TCID₅₀ yang disebabkan oleh efek sitopatik virus dengue tipe 2 tersebut. Dari hasil hibridisasi secara *in situ* ini dapat terlihat bahwa RNA sasaran berada di dalam sitoplasma sel C6/36.

Penggunaan pelacak DNA dalam bidang diagnostik telah berkembang dengan cepat karena sensitivitas dan spesifisitasnya dalam mendeteksi penyakit infeksi dapat diandalkan (Walker & Dougan 1989, Pardue 1987).

Dibandingkan dengan cara hibridisasi lainnya, hibridisasi *in situ* sangat potensial dikembangkan untuk diagnosis infeksi virus dengue karena selain waktu hibridisasi yang dibutuhkan relatif singkat, juga cukup sensitif. Sensitivitas teknik hibridisasi *in situ* ini diperkirakan karena asam nukleat sasaran dideteksi langsung di dalam sel yang terinfeksi dan tidak memerlukan ekstraksi ataupun *blotting*.

Penandaan DNA menggunakan sistem digoksigenin yang dilakukan dengan teknik *random priming* (Boehringer 1989) meningkatkan efisiensi penandaan dan penggunaan bahan niradioaktif ini juga menghindari bahaya yang dihadapi pada penggunaan label dengan bahan radioaktif (Walker & Dougan 1989).

Dari hasil tersebut di atas dapat disimpulkan bahwa (i) Pelacak cDNA, yang merupakan fragmen restriksi *Bam*HI dan *Hinc* II dari plasmid rekombinan pKS-DEN2 yang bersifat tipe spesifik dapat mendeteksi virus dengue tipe 2 dalam sel C6/36 yang terinfeksi melalui hibridisasi DNA-RNA *in situ*, (ii) Hibridisasi *in situ* selain dapat mendeteksi virus dengue di dalam sel, juga dapat menunjukkan lokasi genom RNA virus dengue, yaitu di dalam sitoplasma sel C6/36 yang terinfeksi.

DAFTAR PUSTAKA

- Agus, S.W. 1988. Pemeriksaan laboratorium demam berdarah dengue. *Mikrobiol. Klin. Indon.* 3:76-80.
- Agus, S.W. 1993. Diagnosis mikrobiologi untuk infeksi virus dengue. Simposium Dengue. Jakarta 4 Februari 1993.
- Boehringer Mannheim. 1989. DNA Labeling and Detection nonradioactive. *Biochemica*.
- Deubel, V., M. Laille & J.P. Hugot. 1990. Identification of dengue sequence by genomic amplification: rapid diagnosis of dengue serotypes in peripheral blood. *J. Virol. Methods* 30:41-54.
- Gubler, D.J. 1991. Dengue hemorrhagic fever: a global update. *Virus Information Newsletter* 8:2-3.
- Henchal, E.A., S. Narupiti, R. Feighney, R. Padmanabhan & V. Vakharia. 1987. Detection of dengue virus RNA using nucleic acid hybridization. *J. Virol. Methods* 15:87-200.
- Khan, A.M. & P. Wright. 1987. Detection of flavivirus RNA in infected cell using fotobiotin-labelled hybridization probes. *J. Virol. Methods* 15:121-130.
- Olson, K., C. Blair, R. Padmanabhan & B. Beaty. 1988. Detection of dengue virus type 2 in *Aedes albopictus* by nucleic acid hybridization with strand specific RNA probe. *J. Clin. Microbiol.* 6:579-581.
- Pardue M.L. 1987. Edisi ke-2. *In situ* hybridization, 179-202. B.D. Hames & S.J. Higgins (ed). *Nucleic Acid Hybridization, A Practical Approach*. Oxford: IRL Press Ltd.
- Partana, L., J.S. Partana & S. Tharir. 1970. Hemorrhagic fever shock syndrome in Surabaya, Indonesia. *Kobe J. Med. Sc.* 16:189-202.
- Poerwoedarmo, S.S. 1983. Demam berdarah dengue pada anak. Tesis Doktor. Jakarta: Universitas Indonesia.
- Sambrook, J., E.F. Fritsch & T. Maniatis. 1989. Edisi ke-2. *Molecular Cloning, a Laboratory Manual*. New York : Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Schmidt, N.J. 1979. Edisi ke-5. Cell culture techniques for diagnostic virology, 100. E.H. Lannette & N.J. Schmidt ed. *Viral, Rickettsial, and Chlamydial Infection*. Washington DC: American Public Health Association Inc.
- Scott, R., A. Nisalak & U. Cheamudon. 1980. Isolation of dengue viruses from peripheral blood leukocytes of patients with hemorrhagic fever. *J. Infect. Dis.* 141:1-6.
- Soebandrio, A. 1988. Perkembangan pemeriksaan serologi untuk konfirmasi infeksi dengue di Bagian Mikrobiologi FK-UI. *Mikrobiol. Klin. Indon.* 3:81-83.
- Suroso, T. 1991. Perkembangan demam berdarah dengue di Indonesia. Seminar Demam Berdarah Dengue 8 Juni 1991 di Jakarta. Jakarta: POKJABD.
- Suroso, T. 1993. Kebijakan pemberantasan demam berdarah dengue di Indonesia, xx-xx. Simposium dan Lokakarya Demam Berdarah Dengue, Jakarta 8 Mei 1993. Jakarta.
- Walker, J. & G. Dougan. 1989. DNA Probe, a new role in diagnostic microbiology. *J. Appl. Bacteriol.* 67:229-238.
- World Health Organization. 1975. *Technical Guides for Diagnosis, Treatment, Surveillance, Prevention, and Control of Dengue Hemorrhagic Fever*. Geneva: WHO.