

UJI VIABILITAS VIRUS DENGUE SEROTIPE 3 PADA BEBERAPA GALUR SEL (*CELL-LINE*)

**Dadan Supardan¹, Jaka Widada², Tri Wibawa³,
dan Nastiti Wijayanti⁴**

¹ *Jurusan Tadris IPA Biologi FITK IAIN Mataram*

² *Jurusan Mikrobiologi Fakultas Pertanian Universitas Gadjah Mada*

³ *Fakultas Kedokteran Universitas Gadjah Mada*

⁴ *Jurusan Biologi Fakultas Biologi Universitas Gadjah Mada*

Abstrak

Infeksi virus dengue (DENV) merupakan infeksi yang menjadi salah satu masalah kesehatan utama di dunia dan salah satu infeksi yang sangat berbahaya terutama dinegara tropis seperti Indonesia. Infeksi dengue disebabkan oleh 4 serotipe virus dengue (DENV-1, DENV-2, DENV-3, dan DENV-4). Virus dengue serotipe 3 (DENV-3) merupakan serotipe dengan karakteristik lebih virulen. Sampai saat ini belum tersedia vaksin dan obat untuk pencegahan dan pengobatan infeksi virus dengue, sehingga penelitian penemuan obat demam berdarah sangat penting dilakukan, akan tetapi pengujian virus dengue pada kultur sel atau *cell-line* masih banyak mengalami kendala. Salah satu kendala yang sering dijumpai peneliti dalam pengujian senyawa tertentu terhadap virus dengue yaitu virus tersebut tidak mampu berkembang secara optimal pada beberapa jenis kultur *cell-line*, sehingga dilakukan pengujian untuk mengetahui viabilitas virus dengue pada beberapa kultur *cell-line*. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui kultur *cell line* yang paling cocok digunakan untuk berbagai pengujian infeksi DENV-3.

Kata kunci: *Virus dengue serotipe 3, viabilitas, plaque assay*

PENDAHULUAN

Demam berdarah dengue merupakan penyakit yang penyebarannya paling cepat diantara penyakit dengan vektor nyamuk lainnya. Infeksi virus dengue (DENV) merupakan infeksi yang menjadi salah satu masalah kesehatan utama di dunia (Mackenzie *et al.*, 2004) dan salah satu infeksi yang sangat berbahaya terutama di negara tropis seperti Indonesia. Infeksi dengue disebabkan oleh 4 serotipe virus dengue (DENV-1, DENV-2, DENV-3, dan DENV-4) (Gubler, 1997). Virus dengue serotipe 3 merupakan serotipe yang lebih virulen yang berhubungan dengan tingkat keparahan penyakit yang menyebabkan gejala klinis yang berat (Mansyoer, 1999; Malvage, 2004; Soegijanto, 2006). Sampai saat ini belum tersedia vaksin dan obat untuk pencegahan dan pengobatan infeksi virus dengue, sehingga penelitian pembuatan vaksin dan penemuan obat demam berdarah masih terus dilakukan.

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). Virulensi virus dapat diketahui dari kecepatan replikasi, efek infeksi virus terhadap sel (sitopatologi), dan jumlah genom virus (Rico-Hesse, 2009). Kecepatan replikasi virus dengue secara *in vitro* dapat diketahui menggunakan beberapa uji, salah satunya dengan metode *plaque assay* dan *Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction* (RT-PCR).

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. Galur sel nyamuk, C6/36 diketahui merupakan galur sel yang paling sensitif untuk isolasi virus dengue (Igarashi, 1978). 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). Namun, belum diketahui galur sel mamalia terbaik untuk mendukung pertumbuhan virus

dengue dan menghasilkan titer virus yang tinggi. Sedikitnya informasi mengenai karakter pertumbuhan virus dengue pada galur sel mamalia merupakan salah satu faktor pembatas dilakukannya analisis patogenesis dan uji pembuatan vaksin dan obat 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 dan jumlah titer virus dengue pada setiap galur sel. 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.

METODE PENELITIAN

Penelitian ini menggunakan jenis penelitian eksperimen dengan pendekatan kuantitatif. Pelaksanaan penelitian dilakukan pada bulan Mei 2013 di Laboratorium Parasitologi Fakultas Kedokteran Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta. Penelitian ini menggunakan sampel virus dengue *serotype* 3 dan 3 jenis *cell-line* (C6/36 *cell line*, BHK, dan Vero) serta menggunakan metode kultur *cell-line* secara *in-vitro* dan metode *plaque assay*. Sampel virus dengue dan BHK *cell line* didapatkan dari Lembaga Penelitian Eijkman Jakarta, sampel C6/36 *cell-line* dari Laboratorium Parasitologi UGM, dan Vero *cell-line* dari pusat penelitian kanker UGM (CCRC UGM).

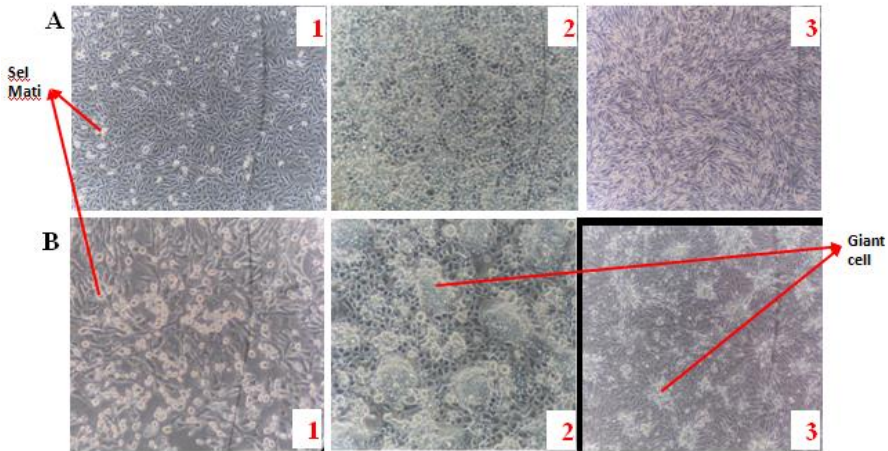
Cell line BHK-21, C6/36 dan Vero pada fase pertumbuhan eksponensial (90-95% konfluen) dipanen dan ditumbuhkan pada 24-well plates dengan jumlah sel $1,5 \times 10^5$ sel setiap well kemudian diinkubasi 24 jam (atau sampai 90-95 % konfluen). Stok virus diencerkan dengan medium DMEM yang mengandung 2% FBS (sel BHK-21 dan Vero, sel C6/36 menggunakan medium MEM) dari 10^{-1} sampai 10^{-6} dengan cara ditambahkan sebanyak 50 μ l supernatant virus (stok) ke dalam 450 μ l medium, kemudian diambil 50 μ l dari pengenceran 10^{-1} dan ditambahkan pada tube

selanjutnya sehingga didapatkan pengenceran 10^{-2} dan seterusnya. Dua ratus mikroliter setiap pengenceran virus ditambahkan pada setiap *wellyang* mengandung jenis sel dan dibuat rangkap tiga, kemudian diinkubasi pada suhu 37°C dalam CO_2 5% selama 1 jam (setiap 15-20 menit digojok), khusus untuk sel C6/36 diinkubasi pada suhu 28°C tanpa CO_2 . Selanjutnya, supernatan dari setiap *well* dibuang, kemudian segera ditambahkan 500 μl 1% karboksimetilselulosa yang mengandung 2% FBS, fungizone 0,5% dan 1,5 % penstrep, inkubasi pada suhu 37°C dalam CO_2 5% selama 3 hari. Setelah inkubasi, fiksasi sel dengan menggunakan 3,7% formalin selama 35 menit, buang overlay metilselulosa dan cuci dengan air mengalir, kemudian sel diwarnai dengan 200 μl 1% kristal violet selama 5 menit. Setelah distaining selama 5 menit, buang kristal violet dan cuci dengan air mengalir kemudian inkubasi pada suhu 55°C atau suhu ruang agar *plaque* terlihat lebih jelas, kemudian dihitung *plaque forming unit/ml* untuk menentukan titer virus menggunakan rumus yang digunakan Lambeth *et al.* (2005), sebagai berikut:

HASIL DAN PEMBAHASAN

Analisis Kultur Sel dan Propagasi Virus Dengue Serotype 3

Sel yang digunakan dalam penelitian adalah BHK-21, C6/36, dan Vero. Hasil pengamatan tiga galur sel kultur setelah masa inkubasi 72 jam secara mikroskopis menggunakan mikroskop *inverted* diperlihatkan pada Gambar 1. Pada gambar terlihat ketiga sel memiliki tipe pertumbuhan yang sama, yaitu tumbuh dengan menempel pada substrat (*adherent-dependent*) sehingga membentuk monolayer.



Gambar 1

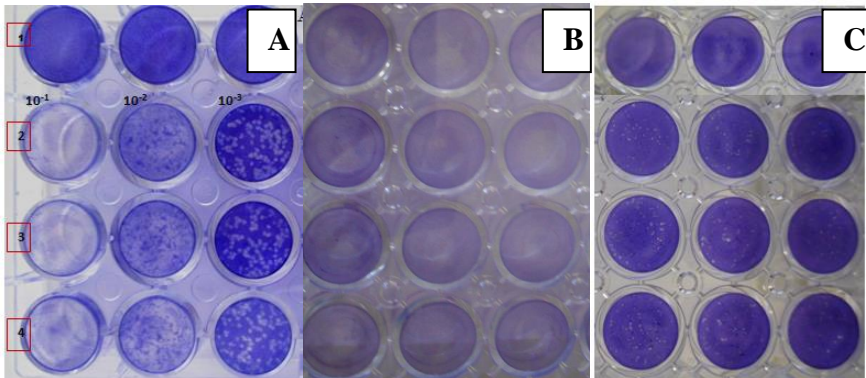
Morfologi ketiga galur sel, pengamatan dibawah mikroskop inverted perbesaran 200x. A) Galur sel (*cell line*) kontrol, B) Galur sel uji. A.1, 2, 3) kontrol sel BHK-21, C6/36 dan Vero. B.1, 2, 3) Galur sel uji BHK-21, C6/36 dan Vero

Berdasarkan hasil pengamatan menggunakan mikroskop *inverted* dengan perbesaran 200x terlihat perbedaan morfologi kultur sel kontrol (sel tanpa infeksi virus) dengan kultur sel uji (sel yang telah diinfeksi virus). Morfologi pada sel kontrol terlihat tumbuh normal dan sehat, hal ini ditandai dengan ukuran sel yang seragam dan hanya sebagian kecil sel yang mati, berbeda dengan morfologi yang ditunjukkan pada sel uji, ketiga sel tersebut menunjukkan pertumbuhan yang tidak normal. Pada sel uji BHK-21 morfologi selnya terlihat lebih panjang dan lebih besar serta banyak sel bulat yang berwarna lebih putih dan mengambang yang menandakan sel tersebut telah mati, selain itu terlihat ruang kosong pada permukaan *flask* yang diakibatkan oleh sel terlepas. Sel yang lisis dan terlepas dari permukaan *flask* diperkirakan akibat infeksi virus dengue serotipe 3. Morfologi galur sel C6/36 dan Vero juga terlihat berbeda antara sel kontrol dan sel uji, pada sel uji menunjukkan adanya perubahan morfologi yaitu sel mengumpul dan membentuk sel yang sangat besar (*Giant cell*) yang menandakan sel tersebut terinfeksi virus. Beberapa tanda pada sel uji yang ditunjukkan pada Gambar 1B merupakan

efek sitopatik yaitu efek yang ditimbulkan oleh adanya infeksi suatu virus pada sel hidup. Hasil tersebut juga sesuai dengan beberapa penelitian sebelumnya, salah satunya disebutkan pada penelitian Guzman and Kouri (1996), bahwa tanda-tanda terjadinya efek sitopatik yaitu terbentuk *giant cell*, permukaan sel tidak rata (bergerigi) dan banyak sel lisis. Berdasarkan hasil tersebut ketiga galur sel mampu atau viabel untuk diinfeksi virus dengue serotipe 3, akan tetapi efek sitopatik paling jelas terlihat pada galur sel C6/36. Hal tersebut diduga disebabkan karena sel C6/36 merupakan sel saliva nyamuk yang merupakan vektor alami virus dengue, sehingga tingkat sensitifitasnya lebih tinggi dibandingkan galur sel yang lain.

Metode *Plaque Assay* (penghitungan titer virus) pada Kultur *Cell-Line* BHK-21, C6/36 dan Vero

Ada beberapa metode yang populer digunakan dalam menentukan titer virus, akan tetapi *gold standard* menurut WHO (2007) dalam menentukan titer virus yaitu menggunakan metode *Plaque Assay*. Lambeth *et al.* (2005), juga menyebutkan bahwa metode *plaque assay* lebih sensitif dan dapat digunakan untuk menentukan jumlah titer virus yang relatif rendah atau sedikit.



Gambar 2. Hasil uji plaque virus dengue serotipe 3 dengan menggunakan tiga galur sel. A) Sel BHK-21, B) Sel C6/36, C) sel Vero. Baris ke-1 merupakan kontrol sel (galur sel yang tidak diinfeksi virus), baris ke-2, 3, dan 4 adalah uji *plaque* dengan menggunakan 3 pengenceran yaitu 10^{-1} sampai 10^{-3} .

Berdasarkan hasil uji pada sel BHK-21 (Gambar 2A) dan hasil perhitungan menggunakan rumus, *plaque* yang terbentuk pada pengenceran 10^{-3} yaitu 92 *plaque* sehingga didapatkan titer virus $4,6 \times 10^5$ PFU/ml dengan lama inkubasi selama 3 hari setelah infeksi, akan tetapi titer virus pada pengenceran 10^{-1} dan 10^{-2} tidak dapat dihitung dikarenakan *plaque* yang dihasilkan lebih banyak sehingga *plaque* tersebut menyatu antara satu dengan yang lainnya. Hal tersebut dikarenakan titer virus pada pengenceran 10^{-1} dan 10^{-2} lebih tinggi, sehingga sel yang lisis lebih banyak. Berbeda dengan jumlah *plaque* yang dihasilkan pada sel Vero (Gambar 2C), pengenceran 10^{-1} menghasilkan jumlah rata-rata *plaque* dari 3 ulangan yaitu 57 *plaque* dengan hasil perhitungan titer $2,85 \times 10^3$ PFU/ml. Pada pengenceran 10^{-3} terbentuk 31 *plaque* sehingga dihasilkan $1,55 \times 10^5$ PFU/ml, jumlah ini berbeda dengan hasil uji pada sel BHK-21. Selain itu, *plaque* yang terbentuk pada sel BHK-21 lebih jelas dibandingkan dengan *plaque* yang terbentuk pada sel Vero, hal ini bisa disebabkan oleh banyak faktor, salah satunya adalah tingkat sensitifitas setiap sel terhadap virus yang berbeda-beda.

Pada galur sel ke-3 yaitu sel C6/36 (Gambar 2B) tidak ada *plaque* yang dihasilkan baik pada pengenceran 10^{-1} , 10^{-2} dan 10^{-3} , hal ini dapat disebabkan oleh banyak hal, selain sensitivitas sel, lama inkubasi setelah infeksi virus juga dapat mempengaruhi jumlah *plaque* yang terbentuk, begitu juga dengan titer virus yang dihasilkan. Henchal & Putnak (1990), menyebutkan bahwa titer tertinggi yang dapat dicapai dari hasil propagasi virus dengue sekitar 10^8 - 10^9 PFU/ml. Titer virus (PFU/ml) dihitung berdasarkan *plaque* yang terbentuk pada setiap faktor pengenceran. Berdasarkan hasil uji *plaque* pada ketiga galur sel, didapatkan hasil *plaque* terbaik dan terbanyak pada galur sel BHK-21 dengan lama inkubasi 3 hari setelah infeksi. Hal ini diduga disebabkan oleh perbedaan karakteristik dari ketiga sel yang digunakan. Pada penelitian Guskey & Jenkin (1975), menyebutkan bahwa karakteristik lipid yang terkandung dalam sel BHK-21 telah diketahui dan terbukti dapat diinfeksi banyak kelompok virus, termasuk kelompok arbovirus. Sel BHK-21 juga sering digunakan untuk memproduksi vaksin (Beynon & Howe 2004).

PENUTUP

Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa ketiga galur sel (cell line) viabel untuk diinfeksi virus dengue serotype 3, akan tetapi hasil terbaik dengan metode plaque assay yaitu pada galur sel BHK-21.

Saran

Saran yang dapat peneliti berikan yaitu: 1) Perlu dilakukan uji molekuler secara genetik untuk memastikan cara penginfeksian virus dengue terhadap galur sel yang berbeda, 2) Perlu dilakukan uji infeksi menggunakan galur sel mamalia yang lebih banyak, 3) Sebaiknya digunakan galur sel BHK-21 untuk uji lanjutan dengan menggunakan metode plaque assay dan virus dengue serotype 3.

DAFTAR PUSTAKA

- Alen, M. M. F., and Schols D., 2012. Dengue Virus Entry as Target for Antiviral Therapy. *J Trop Med.* 628:1-13
- Ara, I., Bukhari, N. A., Aref, N. M., Shinwari, M. M. A., and Bakir, M. A., 2012. Antiviral Activities of Streptomycetes Against Tobacco Mosaic Virus (TMV) in Datura plant: Evaluation of different organic compounds in their metabolites. [*Afr J Biotechnol.* 8:2130-2138.](#)
- Berdy J., 2005. Bioactive Microbial Metabolites (review article). *J. Antibiot.* 58(1):1-26
- Beynon, R. & C. Howe. 2004. *Animal cell culture and technology.* Garland science/BIOS Scientific Publishers. New York: x+288 hlm.
- Gubler, D.J. 1998. Dengue and dengue hemorrhagic fever. *Clinical Microbiology Reviews* 11 (3): 480--498.
- Guskey, L.E, & H. M. Jenkin. 1975. Adaptation of BHK-21 cells to growth in shaker culture and subsequent challenge by

- Japanese Encephalis Virus. *American Society for Microbiology*.
- Guzman MG, Kouri G., 1996. Advances in dengue diagnosis. *Clin Diagn Lab Immunol.*3:621-7.
- Hidari, K. I. P. J., Takahashi, M., Arihara, M., Nagaoka, K., Morita, and Suzuki T., 2008. "Structure and anti-dengue virus activity of sulfated polysaccharide from a marine alga," *Biochem and Biophysical Research Comm.*, 376:91–95.
- Henchal, E. A., and Putnak J. R., 1990. Dengue virus. *Clin Microbiol Reviews.* 3(4): 376--389.
- 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.
- Julander, J. G., Perry, S. T., and Shresta, S., 2011. Important advance in the field of anti-dengue virus research. *Antiviral Chem. And Chemotherapy.* 21:105-116
- Jiang, L., Wu, X., Wu, Y., Bai, Z., Jing, Q., Luo, L., Dong, Z., Yang, Z., Xu, Y., Cao, Y., Di B., Wang., and Wang, M., 2013. Molecular epidemiological and virological study of dengue virus infections in Guangzhou, China, during 2001–2010. *Virology* 45(4):1-9
- Jensen, P. R., Williams, P. G., Oh, D. C., Zeigler, L., and Fenical, W., 2007. Species-specific secondary metabolite production in marine actinomycetes of the genus *Salinispora*. [*Appl Microbiol Biotechnol.* 4:1146-52.](#)
- Kannabiran, S., 2009. Cytotoxic and antimicrobial potential of actinomycete species *Saccharopolyspora salina* VITSDK4 isolated from the Bay of Bengal Coast of India. *Am J Inf Dis.* 5(2):90-98.
- Lambeth, C. R., White, L. J., Johnston, R. E., and Silva, A. M. D., 2005. Flow Cytometry-Based Assay for Titrating Dengue Virus. *J Clin Microbiol.* 7:3267-3272.
- Lee, J-G., Ick D. Y., and Won G., 2007. Differential Antiviral Activity of Benzastatin C and Its Dechlorinated Derivative from *Streptomyces nitrosporeus*. *Biol. Pharm. Bull.* 4:795—797
- Mackenzie J. S., Gubler D. J., and Petersen L. R., 2004. Emerging flaviviruses: the spread and resurgence of Japanese

- encephalitis, West Nile and dengue viruses. *Nature Med.*10:98-109.
- Malvage G. N., Fernando S., D. J., and Sonevirate, S. L., 2004. Dengue Viral Infection. *Post grad med J.* 80:588-601
- Mansyoer A., 1999. *Kapita Selekt kedokteran*. Edisi Kedua, Penerbit Media Aesculapius. FK UI Jakarta: 428 – 430.
- Mohamed, H. S. and Galal, A. M., 2005. Identification and Antiviral Activities of Some Halotolerant Streptomycetes Isolated from Qaroon Lake. *Int J Agri Biol.* 5:747-753.
- Omura, S., Ikeda, H., Ishikawa, J., Hanamoto, A., Takahashi, C., Shinose, M., Takahashi, Y., Horikawa, H., Nakazawa, H., Osonoe, T., Kikuchi, H., Shibai, T., Sakaki, Y., and Hattori, M., 2001. Genome sequence of an industrial microorganism *Streptomyces avermitilis*: deducing the ability of producing secondary metabolites. *Proc Natl Acad Sci.* 98:12215–20.
- Oskay, M., Tamer, A., Usame., and Azeri, C., 2004. Antibacterial activity of some actinomycetes isolated from farming soils of Turkey. *Afr J Biotechnol.* 9:441-446.
- Procopio, R. E. D. L., Silva, I. R. D., Martins, M. K., Azevedo J. L. D., and Araujo, J. M. D., 2012. Antibiotics produced by *Streptomyces*. *Braz J Infect Dis.* 16(5):466–471.
- Ohnishi, Y., Ishikawa, J., Hara, H., Suzuki, H., Ikenoya, M., Ikeda, H., Yamashita, A., Hattori, M., and Horinouchi, S., 2008. Genome sequence of the streptomycin-producing microorganism *Streptomyces griseus* IFO 13350. *J Bacteriol.* 190:4050–60.
- Ravikumar, S., Fredimoses, M., and Gnanadesigan, M., 2012. Anticancer property of sediment actinomycetes against MCF-7 and MDA-MB-231 cell lines. *Asian Pac J Trop Biomed.* 2(2): 92-96
- 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.
- Sadek, P. C., 2002. *The HPLC Solvent Guide Second Edition*. John Wiley and Sons, Inc. New York.