

BUKU PANDUAN ISOLASI DAN DETEKSI VIRUS DENGUE



Ilham H.A.

Teguh H.S.

Siti C.

2021

Lembaga Penyakit Tropis
Universitas Airlangga

BUKU PANDUAN
“ISOLASI DAN DETEKSI VIRUS DENGUE”

2021

Kelompok Studi Dengue
Lembaga Penyakit Tropis
Universitas Airlangga

ISOLASI DAN DETEKSI VIRUS DENGUE

Penulis:

Ilham Harlan Amarullah

Teguh Hari Sucipto

Siti Churrotin

ISBN:-----

Desain sampul dan Tata Letak:

Ilham Harlan Amarullah

Penerbit:

Lembaga Penyakit Tropis, Universitas Airlangga

Redaksi:

Kampus C Jl Mulyorejo

Surabaya 60115

Telp. (031) 5992446

KATA PENGANTAR

Segala puji dan syukur kami panjatkan kehadirat Allah SWT, Tuhan Yang Maha Kuasa karena berkat rahmat dan inayah-Nya kami dapat menyelesaikan penyusunan buku panduan “Isolasi dan Deteksi Virus Dengue” dengan lancar dan tanpa hambatan yang berarti.

Virus dengue adalah salah satu penyebab masalah kesehatan penyakit menular endemis di Indonesia yaitu demam berdarah dengue (DBD). Manifestasi klinis pasien yang terinfeksi virus dengue bervariasi mulai dari asimtomatis, demam dengue hingga sindrom syok dengue yang berpotensi mengancam jiwa. Oleh karena itu peran penelitian tentang virus dengue sangat penting untuk dapat memberikan solusi yang inovatif.

Buku panduan ini disusun dalam rangka memberikan acuan cara isolasi dan deteksi virus dengue. Melalui buku ini pembaca akan diberikan penjelasan tentang kultur sel sebagai media isolasi virus sampai dengan deteksi virus dengue menggunakan teknik biologi molekuler.

Isi buku ini dibagi menjadi tiga bagian. Bab 1 memberikan pengetahuan dasar kultur sel dan aplikasinya untuk inokulasi virus dengue. Pada bab ini pembaca diajarkan teknik kultur sel meliputi passage, freezing, dan thawing sel. pembaca juga dikenalkan dengan cell line yang digunakan untuk media

pertumbuhan virus dengue. Selain itu, pembaca juga ditunjukkan cara deteksi virus dengue pada sampel dengan metode imunostaining. Bab 2 menjelaskan cara ekstraksi RNA virus dengue serta persiapan ekstraksi RNA dari sampel nyamuk. Pada bab ini pembaca dapat mengetahui perbedaan cara ekstraksi virus dengue secara manual menggunakan trizol dan Kit komersial. Bab 3 memberikan informasi cara deteksi serotype virus dengue dengan metode PCR. Pada bab ini pembaca diberikan pemahaman dasar tentang PCR dan perbedaannya dengan Reverse transcription (RT) PCR. Pembaca juga dapat mengetahui panduan visualisasi hasil PCR mulai dari persiapan sampai penggunaan gel agarose.

Kepada semua pihak yang telah berpartisipasi dalam penyusunan dan penerbitan buku ini, kami ucapkan banyak terima kasih. Semoga buku ini dapat bermanfaat bagi para pembaca dalam memahami teknik isolasi dan deteksi virus dengue.

Surabaya, Maret 2021

Tim Penulis

DAFTAR ISI

KATA PENGANTAR	II
DAFTAR ISI	III
BAB 1: KULTUR SEL DAN INOKULASI VIRUS DENGUE	1
KULTUR SEL.....	2
Passage Sel C6/36.....	6
Passage Sel Vero.....	9
Menghitung Sel.....	13
Freezing Sel	17
Thawing Sel.....	19
INOKULASI VIRUS DENGUE	22
IMUNOSTAINING	25
BAB 2: EKSTRAKSI RNA VIRUS DENGUE	31
PERSIAPAN SAMPEL NYAMUK.....	32
EKSTRAKSI DENGAN QIAGEN KIT.....	34
EKSTRAKSI DENGAN TRIZOL	38
BAB 3: DETEKSI VIRUS DENGUE.....	40
RT PCR.....	41

PCR SEROTYPING DENGUE	45
ELEKTROFORESIS GEL AGAROSE.....	49
Pembuatan Gel Agarose	51
Persiapan Larutan Staining	52
Elektroforesis Gel Agarose.....	53
DAFTAR PUSTAKA.....	56
DAFTAR PUSTAKA.....	59
DAFTAR PUSTAKA.....	60

BAB 1: KULTUR SEL DAN INOKULASI VIRUS DENGUE

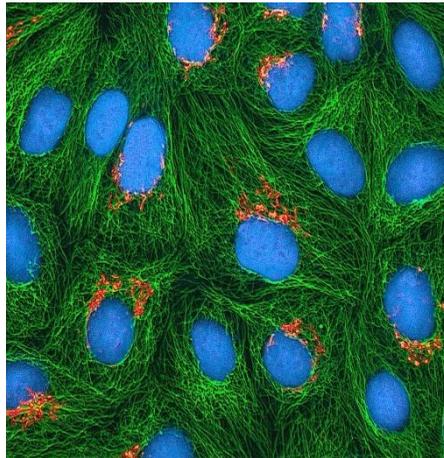


Image: Multiphoton fluorescence image of cultured HeLa cells with a fluorescent protein targeted to Golgi apparatus (orange), microtubules (green), and counterstained for DNA (cyan). Credit: Tom Deerinck, National Center for Microscopy and Imaging, NIH.

KULTUR SEL DAN INOKULASI VIRUS DENGUE

Dalam siklus hidupnya virus tidak dapat tumbuh sendiri. Virus memerlukan media inang khusus untuk dapat berkembangbiak. Inang virus dapat berupa sel eukariotik atau prokariotik tergantung dari jenis virus.

Salah satu cara yang umum digunakan di laboratorium untuk mengembangbiakkan virus adalah dengan media kultur sel. Beberapa keunggulan kultur sel dibanding dengan media yang lain adalah relatif lebih mudah, tidak memakan waktu yang lama, dan dapat memberi hasil yang tinggi.

Pada bab ini pembaca akan dikenalkan dengan teknik dasar kultur sel dan cara inokulasi virus dengue. Sel yang dipakai adalah sel C6/36 dan sel Vero.

KULTUR SEL

Kultur sel dapat diartikan sebagai sebuah proses mengembangbiakkan sel dengan kondisi buatan yang terkontrol. Adapun dalam prakteknya sekarang ini, istilah kultur sel lebih merujuk pada kultur yang berasal dari sel eukariotik selain tanaman.

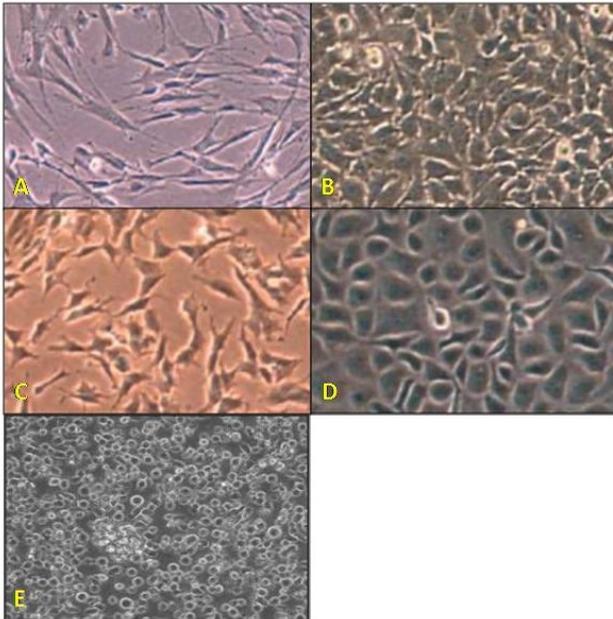
Sejarah kultur sel bisa dikatakan berawal pada tahun 1885 dimana Wilhelm Roux berhasil merawat sel dari embrio ayam di buffer salin. Pada tahun 1907 harrison menumbuhkan sel saraf dari katak secara in vitro dengan metode yang disebut hanging drop. Setelah itu, perkembangan kultur semakin meningkat dan memberikan beberapa pencapaian antara lain pembuatan cell line pertama tahun 1912, penemuan sel HeLa pada tahun 1952, dan pembuatan hibridoma pertama yang dapat menghasilkan antibodi monoklonal pada tahun 1975 [1]. Hingga sekarang kultur sel terus berkembang dalam dunia riset.

Fase kultur pertama kali setelah sel diisolasi dari jaringan dan berkembang di kondisi yang sesuai disebut kultur primer (primary culture). Sub-kultur setelah periode ini, sel dikenal dengan sebutan cell line atau subclone.

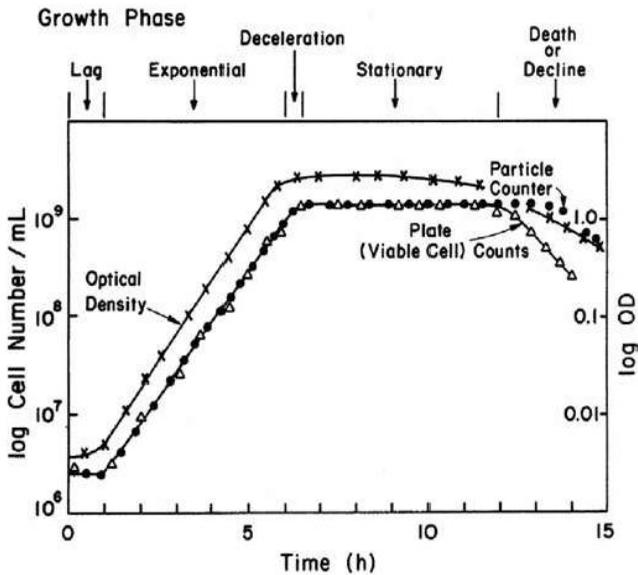
Berdasarkan bentuknya, secara umum sel bisa dibedakan menjadi 5 morfologi yaitu fibroblastic, epithelial-like, endothelial-like, lymphoblast-like, dan neuronal (Gambar 1).

Sel fibroblastic mempunyai ciri bipolar atau multipolar dan bentuk memanjang. Sel epithelial-like berbentuk polygonal dan umumnya seragam. Sel endothelial-like berbentuk pipih dan memiliki inti sel yang berdiameter 1-2 μm bahkan beberapa mencapai 10-20 μm . Sel lymphoblast-like biasanya ditumbuhkan di suspensi tidak menempel dan memiliki bentuk bulat. Sel neuronal memiliki bentuk dan ukuran yang beragam, tetapi pada

dasarnya sel ini dibagi menjadi 2 morfologi yaitu tipe 1(memiliki axon yang panjang) dan tipe 2(tanpa axon) [2].



Gambar 1: Contoh cell line dengan morfologi yang berbeda. A MRC-5 sel fibroblastic, B HeLa sel epithelial-like, C SH-SY5Y sel neuronal, D BAE-1 sel endothelial-like, dan E B95-8 sel lymphoblast-like.



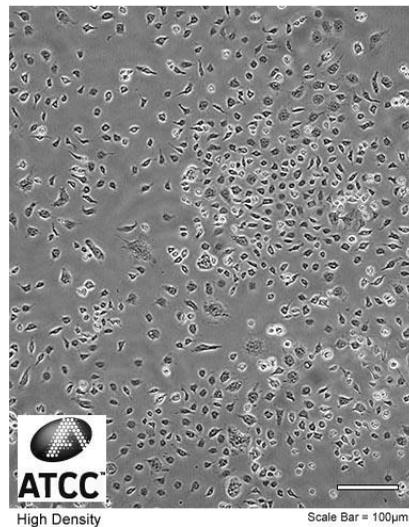
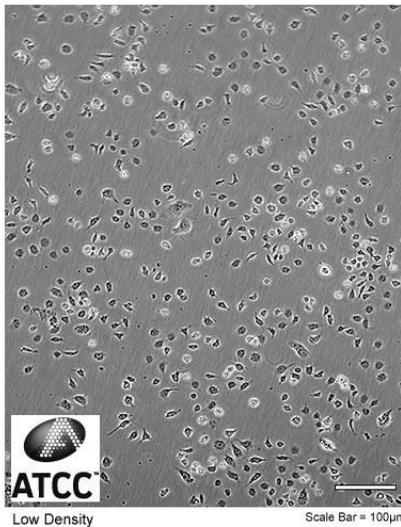
Gambar2: Kurva pertumbuhan kultur sel.

Tahap pertumbuhan kultur sel dibagi menjadi 4 yaitu lag phase, exponential phase, stationary phase dan cell death (Gambar 2). Lag phase adalah fase adaptasi sel terhadap lingkungan baru. Exponential phase disebut juga dengan log phase adalah masa pertumbuhan sel dimana semua komponen sel berkembang dengan laju kecepatan yang sama. Stationary phase terjadi ketika laju pertumbuhan sel menurun. Hal ini terjadi bisa disebabkan karena kekurangan nutrisi dalam medium atau adanya zat hasil sampingan metabolisme yang bersifat beracun terhadap sel. Jika hal ini dibiarkan sel akan mengalami fase cell death. Sesuai namanya dalam fase ini populasi sel hidup menurun drastis dan sel akan mati [2].

Agar sel dapat tumbuh dengan optimal dibutuhkan sebuah kondisi yang ideal tergantung dari tipe sel. Kondisi yang dibutuhkan berbeda antara sel satu dengan yang lain tergantung dari tipe sel. Secara umum kondisi tersebut terdiri dari medium yang mengandung nutrisi, serum, senyawa organik yang dibutuhkan dan wadah yang kondusif yang memberikan suhu, CO₂, kelembapan yang dibutuhkan.

Passage Sel C6/36

ATCC Number: **CRL-1660**™
Designation: **Aedes albopictus clone C6/36**



Gambar 3: sel C6/36

Salah satu cell line yang umum digunakan untuk menumbuhkan virus dengue adalah sel C6/36.

Sel C6/36 (awalnya dikenal sebagai ATC-15 cell line) adalah cell line pertama yang dikembangkan dari larva *Aedes albopictus* [3].

Sel C6/36 adalah semi adherent sel dan memiliki morfologi bulat kecil. Sel ini dapat tumbuh optimal di suhu 28° C, 5% CO₂, dengan 95% udara [4].

Peralatan

- 37°C, 5% CO₂ incubator
- Safety cabinet or clean bench
- Centrifuge (with rotor for 15mL tube)
- Autopipetter
- Waterbath

Material

- Medium (MEM + 10% FBS, 1% L-Glutamine)
- 0,025% Trpsine EDTA
- 15 mL centrifuge tube
- Disposable pipette (5mL and 10mL)
- T-25 flask

Metode

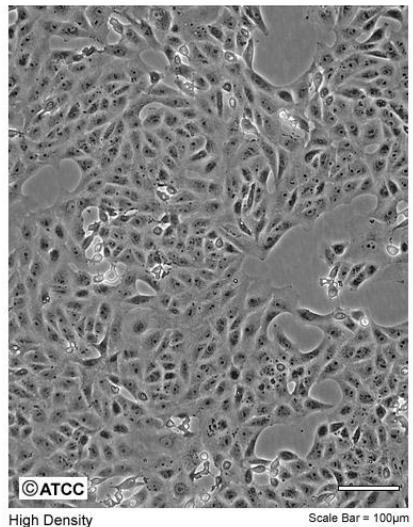
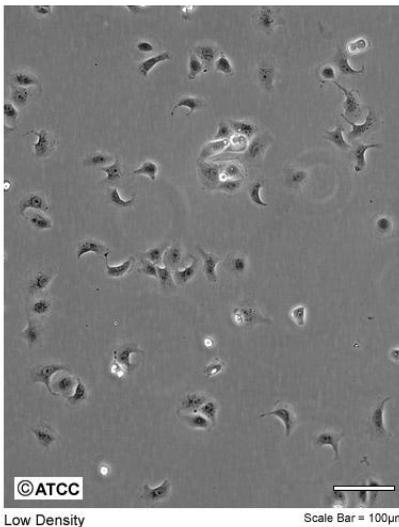
1. Hangatkan medium dengan waterbath sampai mencapai suhu 37°C.
2. Ambil sel yang akan dipassage dan buang medium yang lama. **Catatan:** Gunakan sel yang 80% confluence atau lebih, jangan menggunakan sel yang over-growth.
3. Bilas medium dengan 2 mL 0.025% Trypsine EDTA.
4. Tambahkan 2 mL 0.025% Trypsine EDTA.
5. Masukkan flask dalam inkubator 37°C sampai monolayer lepas menjadi sel tunggal ± 3 menit.
6. Amati sel dengan mikroskop dan pastikan monolayer sudah menjadi sel tunggal.
7. Tambahkan 2 ml medium.
8. Pipet suspensi sel naik turun agar homogen.
9. Siapkan wadah baru untuk kultur.
10. Ambil sel dan inokulasikan ke flask yang baru (vol medium disesuaikan dengan wadah baru (Tabel 1).
Catatan: Ketika passage, jumlah sel dapat dihitung atau tidak disesuaikan dengan kebutuhan (lihat menghitung sel). Jika hanya sekedar ingin menjaga pertumbuhan sel, maka sel tidak perlu dihitung. Tipikal konsentrasi sel yang dibuat untuk passage baru adalah $1.5 - 2.5 \times 10^6$ cells/ml.
11. Letakkan sel dalam inkubator 37°C, 5% CO₂.

Passage Sel Vero

Salah satu cell line yang sering digunakan dalam penelitian secara global dan sudah mendapatkan lebih dari 10000 kutipan publikasi riset adalah sel vero [5].

Sel ini berasal dari monyet hijau afrika (*Cercopithecus aethiops*) yang sehat. Sel ini diisolasi pertama kali oleh Yasumura dan Kawakit pada bulan maret tahun 1962 di Universitas Chiba, Chiba, Jepang.

ATCC Number: **CCL-81**
Designation: **Vero**



Gambar 4: Sel vero

Morfologi sel vero adalah epithelial-like berbentuk polygonal dan termasuk dalam kategori adherent sel. Sel ini bersifat kontinu atau dapat hidup terus menerus [5].

Oleh karena sifat tersebut dan sensitivitasnya terhadap berbagai macam virus, sel vero telah banyak dipakai di bidang virologi contohnya sebagai media propagasi H5N1, MERS, dan Dengue [5].

PENTING

- **Sel line yang berasal dari mamalia harus mendapatkan CO₂.**
- **Pastikan Sel monolayer mencapai 80% konfluensi sebelum pasase baru dilakukan.**
- **Pastikan medium terbuang semua sebelum penambahan tripsin karena FBS pada medium dapat menghambat kerja tripsin.**
- **Paparan Tripsin tidak boleh terlalu lama karena dapat merusak sel.**

Peralatan

- 37°C, 5% CO₂ incubator
- Safety cabinet or clean bench
- Centrifuge (with rotor for 15mL tube)
- Autopipetter
- Waterbath

Material

- Medium (MEM + 10% FBS, 1% L-Glutamine)
- 0,025% Trypsine EDTA
- 15 mL centrifuge tube
- Disposable pipette (5mL and 10mL)
- T-25 flask

Metode

1. Hangatkan medium dengan waterbath sampai mencapai suhu 37°C.
2. Ambil sel yang akan dipassage dan buang medium yang lama. **Catatan:** Gunakan sel yang 80% confluence atau lebih, jangan menggunakan sel yang over-growth.
3. Bilas medium dengan 2 mL 0.025% Trypsine EDTA.
4. Tambahkan 2 mL 0.025% Trypsine EDTA.
5. Masukkan flask dalam inkubator 37°C sampai monolayer lepas menjadi sel tunggal ± 3 menit.
6. Amati sel dengan mikroskop dan pastikan monolayer sudah menjadi sel tunggal.
7. Tambahkan 2 ml medium.
8. Pipet suspensi sel naik turun agar homogen.
9. Siapkan wadah baru untuk kultur.

10. Ambil sel dan inokulasikan ke flask yang baru (vol medium disesuaikan dengan wadah baru (Tabel 1).

Catatan: Ketika passage, jumlah sel dapat dihitung atau tidak disesuaikan dengan kebutuhan (lihat menghitung sel). Jika hanya sekedar ingin menjaga pertumbuhan sel, maka sel tidak perlu dihitung. Tipikal konsentrasi sel yang dibuat untuk passage baru adalah $1.5 - 2.5 \times 10^6$ cells/ml.

11. Letakkan sel dalam inkubator 37°C , 5% CO_2 .

Tabel 1: Skema passage kultur sel.

Container	Washing	Trypsin	Neutralizing medium	New container	Total vol (Medium+seed)
T25	1 ml	1 ml	1 ml	T25	5 ml
				T75	15 ml
				96 well plate	10 ml 100 μl /well
				48 well plate	10 ml 200 μl /well
				24 well plate	10 ml 400 μl /well
				12 well plate	10 ml 800 μl /well
6 well plate	12 ml 2 ml/well				
T75	2 ml	2 ml	2 ml	T25	5 ml
				T75	15 ml
				96 well plate	100 μl /well
				48 well plate	200 μl /well
				24 well plate	400 μl /well
				12 well plate	800 μl /well
6 well plate	2 ml/well				

Menghitung Sel

Selain safety cabinet dan incubator, salah satu alat yang penting dalam kultur sel adalah hemasitometer. Alat kecil berupa kaca tebal ini berfungsi untuk menghitung jumlah sel secara cepat dan akurat. Hemasitometer ditemukan pertama kali oleh Louis-Charles Malassez pada tahun 1874 yang awalnya dimaksudkan untuk menghitung sel darah.

Sekarang ini terdapat banyak tipe hemasitometer antara lain Neubauer, Burker, Thoma dan Fuchs-Rosenthal. Masing masing tipe mempunyai pola garis garis mikroskopis (grid) yang berbeda.

Berikut adalah metode menghitung sel dengan hemasitometer Neubauer. Tipe ini adalah yang paling umum digunakan dalam kultur sel.

PENTING

- **Hitung minimal 3 kotak untuk mendapatkan jumlah sel yang akurat.**

Peralatan

- Haemocytometer
- Cover slip
- Counter
- Pipette
- 1 ml vial
- Mikroskop

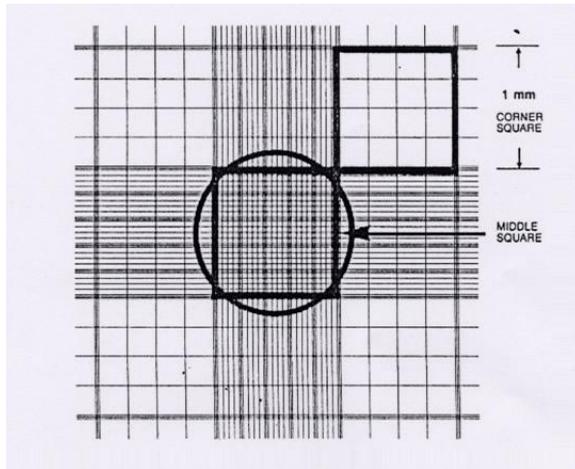
Material

- Sel Vero
- Medium (MEM + 10% FBS, 1% L-Glutamine)
- 0.4% Trypan blue stain

Metode

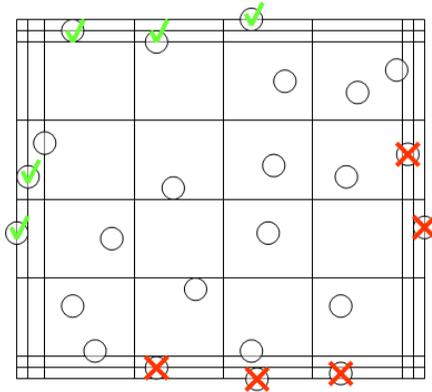
1. Pastikan hemacytometer dan cover slip bersih. Gunakan alkohol jika belum bersih.
2. Pasang cover slip di hemacytometer.
3. Siapkan suspensi sel dan campurkan dengan 0.4% trypan blue stain di vial dengan perbandingan 1:1. Contoh 100 μ l sel dan 100 μ l 0.4% trypan blue stain. **Catatan:** jika diperlukan sel dapat didilusi terlebih dahulu sebelum dicampur dengan 0.4% trypan blue stain.

- Pipet sel mix ($\pm 10 \mu\text{l}$) di tepi coverslip dan biarkan mengalir dibawah cover slip.
- Lihat hemasitometer grid dibawah mikroskop.



Gambar 5: grid hemasitometer dilihat dengan mikroskop. Empat kotak besar di pojok adalah lokasi untuk menghitung sel [6].

- Hitung sel yang hidup dan yang mati. **Catatan:** Sangat direkomendasikan untuk menghitung 40 – 70 sel untuk mendapatkan data yang akurat. Maka dari itu menghitung lebih dari satu kotak mungkin diperlukan. Cara menghitung sel dapat dilihat di gambar 6.



Gambar 6: sistem perhitungan sel untuk memastikan akurasi dan konsistensi. Sel yang dihitung adalah sel yang terdapat di dalam kotak besar. Selain itu sel yang meliwati batas di 2 dari 4 sisi kotak besar juga dihitung selama sel masih menyentuh garis tengah. Contoh diatas menunjukkan bulatan-bulatan kecil adalah sel, warna hijau menandakan sel ikut dihitung dan warna merah berarti sel tidak dihitung [6].

7. Hitung konsentrasi sel dengan rumus berikut:

$$\text{Sel konsentrasi (cells/ml)} = \frac{\text{Jumlah sel} \times 10000 \times \text{Faktor dilusi}}{\text{Jumlah kotak}}$$

Freezing Sel

Sebagai media pertumbuhan dan analisis virus sel yang dibutuhkan tentu tidak terbatas. Sehingga dibutuhkan metode untuk dapat menyimpan dan memperbanyak sel supaya dapat digunakan dalam jangka panjang. Cara tersebut adalah dengan menyimpan sel pada suhu beku rendah -80°C (Cryopreservation).

Keadaan media ketika beku berbeda dengan media dalam keadaan cair. Hal ini perlu diperhatikan karena dapat merusak sel yang kita simpan. Dalam keadaan beku air membentuk Kristal yang dapat merusak sel.

Untuk mengatasi hal tersebut media yang digunakan untuk pembekuan sel harus ditambah dengan cryopreservant seperti DMSO, glycerol, atau dengan reagen komersial Cell banker.

Sebagai contoh, dibawah ini pembaca akan diajarkan cara freezing Sel Vero.

Peralatan

- 37°C , 5% CO_2 incubator
- Safety cabinet or clean bench
- Centrifuge (with rotor for 15mL tube)
- Autopipetter

- Waterbath

Material

- Medium (MEM + 10% FBS, 1% L-Glutamine)
- 0,025% Trpsine EDTA
- 15 mL centrifuge tube
- Disposable pipette (5mL and 10mL)
- T-25 flask

Metode

1. Ambil medium baru dari kulkas dan siapkan sebanyak 9 ml
2. Tambahkan 1 ml DMSO dan campurkan hingga merata dengan membolak balikkan tube.
3. Diamkan media dalam es.
4. Ambil sel yang akan dipassage dan buang medium yang lama. **Catatan:** Gunakan sel yang 80% confluence atau lebih, jangan menggunakan sel yang over-growth.
5. Bilas medium dengan 2 mL 0.025% Trypsine EDTA.
6. Tambahkan 2 mL 0.025% Trypsine EDTA.
7. Masukkan flask dalam inkubator 37⁰C sampai monolayer lepas menjadi sel tunggal \pm 3 menit.
8. Amati sel dengan mikroskop dan pastikan monolayer

sudah menjadi sel tunggal.

9. Tambahkan 2 ml medium.
10. Pipet suspensi sel naik turun agar homogen.
11. Hitung jumlah sel.
12. Siapkan tube untuk penyimpanan sel.
13. Ambil sel dan masukkan sejumlah ke tiap tube.....
14. Letakkan sel kedalam freezer -80°C .

Thawing Sel

Cell line yang telah dikultur dalam jangka waktu yang lama memiliki potensi untuk berubah sifat dan karakternya. Maka dari itu setiap kali melakukan kultur sel, passage number selalu ditulis. Untuk mendapatkan sel dengan karakteristik atau sifat yang sama selama penelitian, maka kita perlu mengambil sel dari stok yang ada yaitu sel yang telah dibekukan.

Proses ini disebut cell recovery atau thawing cell. Keberadaan cryopreservant agent adalah racun bagi sel ketika media dalam keadaan cair. Maka dari itu proses thawing sel harus dilakukan secara cepat dan hati hati supaya sel tidak rusak dan mendapatkan hasil yang optimal.

Peralatan

- 37°C, 5% CO₂ incubator
- Safety cabinet or clean bench
- Centrifuge (with rotor for 15mL tube)
- Autopipetter
- Waterbath

Material

- Medium (MEM + 10% FBS, 1% L-Glutamine)
- 15 mL centrifuge tube
- Disposable pipette (5mL and 10mL)
- T-25 flask

Metode

1. Hangatkan medium dengan waterbath sampai mencapai suhu 37°C.
2. Nyalakan dan sterilkan BSC dengan UV light selama 10 menit kemudian dengan ethanol 70%.
3. Siapkan medium, autopipettor, T-25 Flask, dan wadah sampah didalam BSC.
4. Siapkan 10 ml medium di 15 ml tube dan 4 ml medium di flask T25.
5. Ambil sel stok yang akan digunakan untuk recovery.

6. Cairkan sel dengan panas tubuh (genggaman tangan).
7. Setelah sel stok mencair, masukkan kedalam 10 ml medium di tube.
8. Sentrifuge selama 5 menit 2000 rpm.
9. Buang supernatant dan tambahkan 1 ml medium ke pellet.
10. Pipet naik turun agar sel merata dan homogen.
11. Masukkan kedalam flask T25.
12. Amati sel dengan mikroskop dan pastikan sel merata (tidak menggumpal).
13. Tambahkan 2 ml medium.
14. Letakkan sel kedalam inkubator 37⁰C, 5% CO₂.

INOKULASI VIRUS DENGUE

Virus dengue (DENV) termasuk dalam genus flavivirus keluarga flaviviridae yang transmisinya melalui gigitan nyamuk *Aedes sp.*

Virus ini memiliki genom yang tersimpan dalam bentang single-strand RNA dengan panjang basa nukleotida ± 11 kb yang bermuatan positif [7].

Infeksi virus dengue memberikan respon yang bermacam-macam pada setiap individu, mulai asimtomatik dan gejala ringan hingga menyebabkan demam hemoragik dengan dan tanpa kejang. Beberapa gejala infeksi virus dengue yang dapat terjadi yaitu demam ringan, dengue fever (DF), dengue hemorrhagic fever (DHF), dan dengue shock syndrome (DSS).

Salah satu cell line yang dapat digunakan untuk perkembangbiakan DENV adalah sel vero. Studi melaporkan bahwa penempelan DENV terhadap vero dimediasi oleh heparin sulfat dan 2 surface protein yang berukuran 74 dan 44 kDa. Heparin sulfat dianggap berfungsi untuk mengkonsetrasikan virus di permukaan sel yang selanjutnya diikuti oleh endositosis DENV [8].

Peralatan

- Autopipetter
- Culture plate (96 well plates)
- Micropipette
- Multichannel pipette
- 37°C, 5% CO₂ incubator
- safety cabinet or clean bench
- Microscope

Material

- Sample atau inokulum
- Medium (MEM + 10% FBS, 1% L-Glutamine)
- Sterilized tips (200µL and 10µL)
- Disposable pipettes (5 ml,10ml)

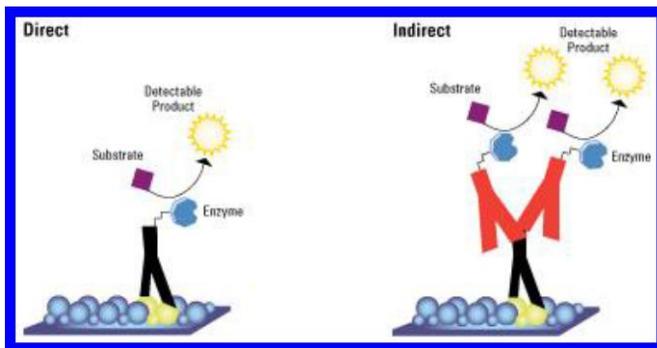
Metode

1. Siapkan sel vero di 96 well plates.
2. Masukkan sel kedalam inkubator 37°C, 5% CO₂ sampai sel mencapai 80% confluence atau monolayer (\pm 1-2 hari).
3. Untuk inokulasi primer maka siapkan dilusi spesimen 11x yaitu 5 µl dalam 60 µl medium per well. Untuk blind passage maka siapkan kultur lama yang akan di passage.
4. Buang medium sel vero yang lama.

5. Pindahkan 50 μl sample ke sel vero.
6. Goyangkan plate dengan tangan agar campuran di plate merata.
7. Inkubasi plate di 37°C, 5% CO₂ selama 1 jam. **Catatan:**
Goyangkan plate setiap 15 menit sekali.
8. Tambahkan 50 μl medium baru.
9. Inkubasi plate di 37°C, 5% CO₂ selama 3-4 hari.
10. Amati sel dibawah mikroskop setiap hari untuk mengetahui CPE.

IMMUNOSTAINING

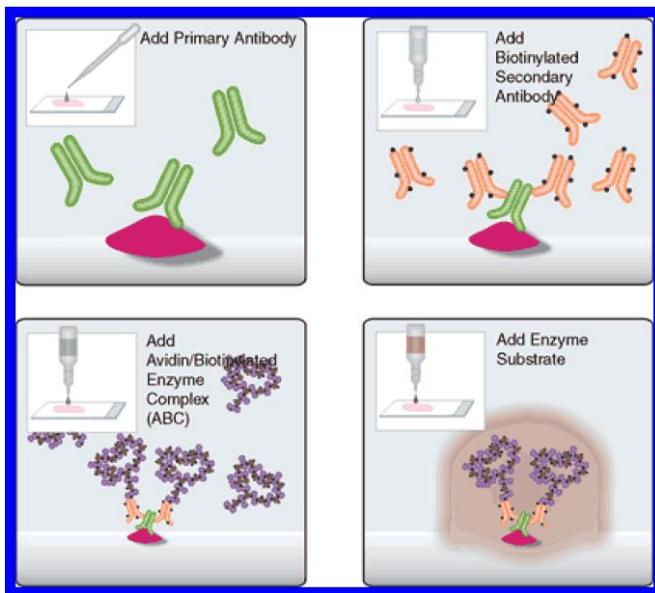
Istilah immunostaining pada awalnya merujuk pada pewarnaan imunohistokimia pada jaringan yang pertama kali dilakukan oleh Albert Coons tahun 1941 [9]. Tetapi sekarang immunostaining diartikan sebagai sebuah metode pewarnaan yang berbasis antibodi dan aplikasinya meliputi banyak bidang termasuk histologi, biologi sel, dan biologi molekuler. Beberapa teknik yang termasuk dalam immunostaining adalah immunohistochemistry, Flow cytometry, Western blot, ELISA, dan Immuno-electron microscopy.



Gambar 7: Prinsip kerja direct dan indirect immunohistochemistry.

Immunohistochemistry (IHC) (pewarnaan jaringan) disebut juga dengan immunocytochemistry (ICC) (pewarnaan sel) adalah salah satu teknik pewarnaan yang sering dipakai dalam kultur sel. teknik ini berdasar pada afinitas antigen-antibodi dan kemampuannya untuk mengidentifikasi protein target dengan label tertentu. Ada dua macam tipe ICC yaitu direct dan indirect

(gambar 5). Pada direct ICC, first antibody yang memiliki label akan menempel pada protein target. Perlakuan setelahnya membuat protein target terdeteksi. Pada indirect ICC, second antibody diberikan sebagai perantara antara first antibody dan sistem deteksi. Pada metode ini first antibody tanpa label akan menempel pada protein target. Second antibody dengan label akan berikatan dengan first antibody yang kemudian akan dideteksi dengan sistem yang sama seperti dalam direct ICC [10].



Gambar 8: Proses pewarnaan indirect ICC dengan reaksi HRP dan substrate-chromogen. Proses berurutan dari pojok kiri atas, ke kanan atas, ke kiri bawah, dan berakhir di pojok kanan bawah.

Label yang digunakan pada ICC ada 2 macam yaitu tipe enzim dan fluoresens. Enzim yang umum digunakan dan dapat dilihat

dengan mikroskop cahaya yang disebut dengan istilah “brightfield” adalah horseradish peroxidase (HRP) yang bereaksi dengan substrate-chromogens. Terdapat banyak jenis substrate-chromogens seperti DAB, NovaRed, VIP, dan AEC. Contoh proses pewarnaan indirect ICC dengan HRP dapat dilihat pada gambar 6. Keunggulan dari metode berbasis enzim adalah pewarnaan stabil, permanen, dan bersifat counterstaining [10].

PENTING

- **Pastikan antibodi pertama dan kedua tidak tertukar.**
- **Pastikan step cuci sampel sempurna.**
- **Pastikan penambahan stop solution tidak lebih dari 15 menit.**

Sampel:

- Kultur virus dengue

Peralatan

- Pipette
- Multichannel pipette

- Tray
- Microscope

Material

- Cold Acethone-Methanol stored in-30°C
- PBS solution 10x
- NHS
- 4G2 (first antibody)
- Biotinylated anti mouse IgG (Second antibody)
- Avidin & Biotin Complex
- VIP substrate
- 1,5 ml eppendorf tube
- Sterilized tips (200 µl and 10 µl)
- Tissue

Metode

A. Persiapan Reagen

Volum yang dibutuhkan untuk tiap well adalah 200 µl untuk 24 well plates dan 50 µl untuk 96 well plates. Reagen dan persiapannya dituliskan pada tabel.

Tabel 2: Reagen yang dibutuhkan dan cara persiapannya.

Solution	Material	Volume	Solvent	Volume
PBS working solution stock	PBS 10 X	5 ml	Ultrapure Water	45 ml
1% NHS solution	NHS	15 µl	PBS 1 X	15 ml
First antibody (1:1000)	4G2	5 µl	1% NHS solution	5 ml
Second antibody (1:500)	Biotinylated anti mouse IgG	10 µl	1% NHS solution	5 ml
ABC mix	ABC kit	80 µl @ 16 µl/ml	PBS1 X	5 ml
VIP mix	VIP kit	120 µl @ 24 µl/ml	PBS1 X	5 ml

B. Fiksasi Sebelum Immunostaining

1. Buang cairan kultur yang lama.
2. Bilas sel dengan 50 µl PBS 1X.
3. Keringkan plate selama kurang lebih 2 jam dengan bantuan kipas angin.
4. Lakukan fiksasi dengan 50 µl cairan cold acetone-methanol solution.
5. Letakkan plate di -30°C minimal selama 30 menit.
6. Buang cairan acetone-methanol.
7. Keringkan plate ±15 menit.

C. Immunostaining

1. Blok dengan 1% NHS selama 10 menit.
2. Tambahkan 50 µl 1st antibody (4G2 berasal dari cairan asetic tikus).
3. Inkubasi selama 30 menit di suhu ruangan.
4. Bilas dengan 50 µl PBS 1X, tiga kali.

5. Tambahkan 50 μl 2nd antibody (Biotinylated anti mouse IgG)
6. Inkubasi selama 30 menit di suhu ruangan.
7. Siapkan Avidin & Biotin complex (ABC).
8. Bilas dengan 50 μl PBS 1X, tiga kali.
9. Tambahkan 50 μl ABC mixture.
10. Inkubasi selama 30 menit di suhu ruangan.
11. Bilas dengan 50 μl PBS 1X, tiga kali.
12. Siapkan dan tambahkan 50 μl VIP substrate.
13. Tunggu selama \pm 10 menit.
14. Buang VIP substrate.
15. Tambahkan 50 μl PBS 1X.
16. Lakukan observasi sel dibawah mikroskop.

BAB 2 EKSTRAKSI RNA

VIRUS DENGUE

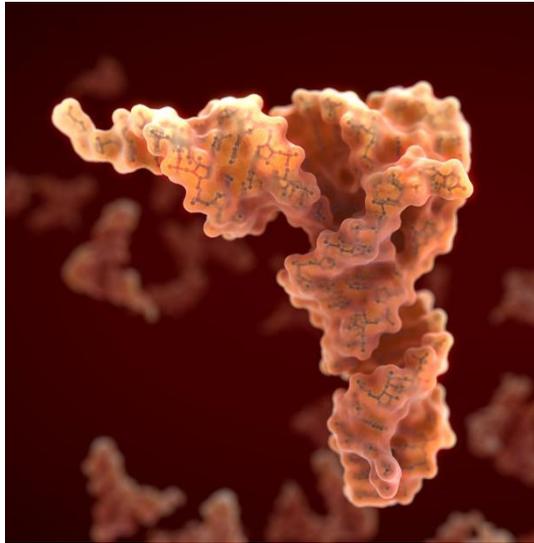


Image: A transfer RNA is an adaptor molecule composed of RNA, typically 73 to 94 nucleotides in length, that serves as the physical link between the nucleotide sequence of nucleic acids (DNA and RNA) and the amino acid sequence of proteins. John Liebler. Art of the Cell.

BAB 2 EKSTRAKSI RNA VIRUS DENGUE

Genom virus dengue berupa untai tunggal positif RNA dengan panjang ± 11 kb. Genom virus ini menyandi 3 protein struktural dan 7 protein nonstruktural. Genom ini akan ditranslasikan menjadi satu untaian panjang polipeptida yang kemudian dipotong menjadi 10 proteins yang berfungsi untuk replikasi dan pembentukan virus baru [11].

Untuk dapat mendeteksi virus dengue dengan metode biologi molekuler menggunakan PCR, maka RNA virus perlu diisolasi terlebih dahulu.

Pada bab ini pembaca akan dijelaskan cara ekstraksi RNA virus dengue baik dengan kit atau manual menggunakan trizol. Selain itu persiapan sampel untuk ekstraksi RNA dari nyamuk juga diberikan.

PERSIAPAN SAMPEL NYAMUK

Dalam persebarannya virus dengue dibantu oleh nyamuk dari genus *Aedes* sebagai vektor. Vektor virus dengue yang utama adalah nyamuk *Aedes aegypti*.

Brikut ini adalah cara isolasi virus dengue dari nyamuk *Aedes aegypti*.

Sampel

- Nyamuk

Peralatan

- Mikropipet
- Pellet pestle
- Centrifuge

Material

- PBS 1x

Metode

1. Nyamuk hidup dibunuh dengan pembekuan (freeze-killed) di suhu -30°C .
2. Siapkan 10 ekor di dalam 1.5 ml tube
3. Tambahkan 300 μl PBS.
4. Nyamuk digerus dengan pellet pestle sampai homogeny (\pm 10 menit).
5. Sampel kemudian disentrifuse 12000 rpm selama 5 menit.
6. Supernatant diambil untuk ekstraksi RNA.

EKSTRAKSI DENGAN QIAGEN KIT

QIAamp viral RNA mini Kit (Qiagen) adalah salah satu kit untuk mengisolasi RNA dengan fast spin-column atau prosedur vakum. Metode ini tidak menggunakan fenol dan kloroform sama sekali. Prinsip dasar kerjanya adalah RNA virus akan melekat pada membran gel silika QIAamp sedangkan molekul yang lain akan melewatinya. Langkah washing dua kali secara efektif membuang molekul yang dapat mengganggu proses PCR seperti divalent kation dan protein. Sehingga hasil akhirnya adalah virus RNA murni yang di elusi didalam buffer atau air.

Sampel

- Serum, plasma, cairan kultur

Peralatan

- Mikropipet
- Vortex
- Sentrifuge

Material

- Mengacu pada QIAamp Viral RNA Mini Kit (Qiagen)

Metode

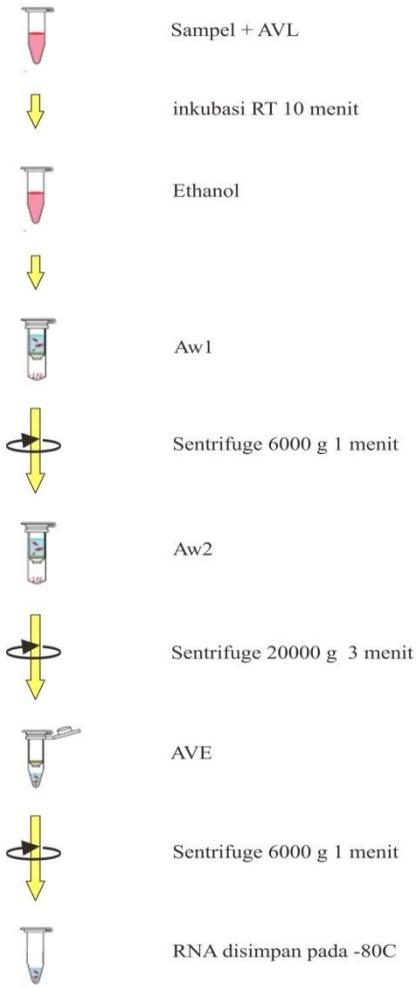
1. Siapkan campuran buffer AVL dan carrier RNA sesuai dengan jumlah sampel yang dikerjakan (lihat tabel).
2. Siapkan 140 µl sampel (serum, plasma, urin, supernatant kultur sel, atau cairan non sel) di tube 1.5 ml.
3. Tambahkan 560 µl buffer AVL yang mengandung carrier RNA.
4. Campurkan dengan vortex selama 15 detik.
5. Inkubasikan pada suhu ruang selama 10 menit.
6. Sentrifuge singkat atau spin down agar seluruh cairan berada di dasar tube.
7. Tambahkan 560 µl ethanol 96%.
8. Campurkan dengan vortex selama 15 detik kemudian sentrifuge singkat.
9. Pindahkan 630 µl larutan dari langkah 6 ke QIAamp Mini column (dengan 2 ml tube koleksi).
10. Tutup column dan sentrifuge 6000g (8000 rpm) selama 1 menit.
11. Pindahkan QIAamp Mini column ke 2 ml tube koleksi yang baru dan buang tube lama yang mengandung filtrat.
12. Bukan QIAamp Mini column dan ulangi langkah 8 – 10.
13. Tambahkan 500 µl buffer AW1.
14. Tutup column dan sentrifuge 6000g (8000 rpm) selama 1 menit.

15. Pindahkan QIAamp Mini column ke 2 ml tube koleksi yang baru dan buang tube lama yang mengandung filtrat.
16. Tambahkan 500 µl buffer AW2.
17. Tutup column dan sentrifuge 20000g (14000 rpm) selama 3 menit.
18. Siapkan 1.5 ml tube dan beri label.
19. Pindahkan QIAamp Mini column ke 1.5 ml tube yang baru dan buang tube lama yang mengandung filtrat.
20. Tambahkan 60 µl buffer AVE dan inkubasikan di suhu ruang selama 1 menit.
21. Sentrifuge 6000g (8000 rpm) selama 1 menit.
22. Simpan RNA yang telah didapat di -80°C.

Tabel 3: Volum campuran buffer AVL dan carrier RNA.

n-sampel	Vol buffer AVL (ml)	Vol carrier RNA (µl)
1	0.56	5.6
2	1.12	11.2
3	1.68	16.8
4	2.24	22.4
5	2.80	28.0
6	3.36	33.6
7	3.92	39.2

Alur Pengerjaan



Gambar 9 : Alur ekstraksi RNA dengan Kit Qiagen

EKSTRAKSI DENGAN TRIZOL

Sampel

- Serum, plasma, cairan kultur

Peralatan

- Mikropipet
- Vortex
- Sentrifuge

Material

- Trizol
- Kloroform
- Isopropyl alcohol
- Ethanol 75%
- RNase-free water

Metode

1. Siapkan sampel didalam tube sebanyak 300 µl.
2. Tambahkan 700 µl Trizol dan guncangkan agar larutan tercampur merata.
3. Inkubasikan di suhu ruang selama 5 menit.
4. Tambahkan kloroform 200 µl dan guncangkan agar larutan tercampur merata.
5. Inkubasikan di suhu ruang selama 3 menit.

6. Sentrifuge 12000 g selama 15 menit 4°C.
7. Pindahkan larutan aqueous ke tube baru.
8. Tambahkan isopropyl alcohol sebanyak 500 µl dan goncangkan agar larutan tercampur merata.
9. Inkubasikan di suhu ruang selama 10 menit.
10. Sentrifuge 12000 g selama 10 menit 4°C.
11. Buang supernatant dan cuci pellet RNA dengan ethanol 75% 1 ml.
12. Vortex dan sentrifuge 7500 g selama 5 menit 4°C.
13. Keringkan RNA selama 5-10 menit.
14. Larutkan RNA di 60°C. RNase free water sebanyak 15 µl.
15. Simpan di suhu -80°C.

BAB 3 DETEKSI VIRUS

DENGUE

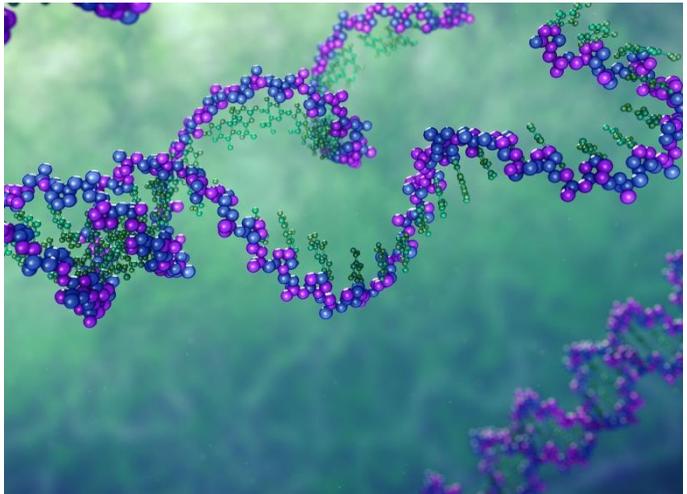


Image: DNA structure from pdb 1AOI. John Liebler. Art of the Cell.

BAB 3 DETEKSI VIRUS DENGUE

Ada beberapa metode untuk mendeteksi virus dengue berdasarkan target yang berbeda yaitu asam nukleat, antigen virus, dan antibodi.

Antigen virus dan antibody spesifik dapat diketahui dengan metode ELISA atau kit uji cepat. Sedangkan asam nukleat dapat dideteksi dengan metode PCR (Polymerase Chain Reaction) setelah genom diisolasi.

RT PCR

Teknik RT PCR (Reverse transcription Polymerase Chain Reaction) adalah salah satu jenis PCR yang umumnya digunakan di bidang biologi molekuler untuk mendeteksi ekspresi RNA [12].

RT PCR dan konvensional PCR berfungsi untuk memperbanyak target DNA, akan tetapi aplikasi keduanya berbeda. Konvensional PCR memperbanyak DNA secara eksponensial dari gen target. Sedangkan RT-PCR digunakan untuk membuat DNA komplemen dari RNA target gen dengan bantuan enzim reverse transcriptase. cDNA yang terbentuk kemudian dapat diperbanyak dengan konvensional PCR [12] [13].

Dengue termasuk dalam golongan virus RNA maka dari itu RNA yang telah diisolasi harus diubah menjadi cDNA terlebih dahulu

untuk dapat dideteksi secara biologi molekuler dengan metode PCR [11].

Berikut ini dijelaskan cara RT PCR menggunakan SuperScript™ III First-Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen).

Tabel 4: Primer spesifik gen untuk RT dan PCR virus dengue [14].

Primer	Sekuen	Posisi Genom	Ukuran produk PCR (bp)
D1	5'-TCAATATGCTGAAACGCGCGAGAAACCG-3'	134-161	
TS1	5'-CGTCTCAGTGATCCGGGG-3'	568-586	482
TS2	5'-CGCCACAAGGCCATGAACAG-3'	232-252	119
TS3	5'-TAACATCATCATGAGACAGAGC-3'	400-421	290
TS4	5'-CTCTGTTGTCTTAAACAAGAGA-3'	506-527	392

PENTING

- **Persiapan reagen PCR harus dengan es atau cooler pack.**
- **Pastikan sampel didiamkan di es 2 menit sebelum menambahkan mastermix 2 agar produk PCR tidak menguap.**

Sampel

- RNA virus dengue

Peralatan

- Mesin PCR
- Sentrifuge
- Ice block
- mikropipet

Material

- Mengacu pada SuperScript™ III First-Strand Synthesis System for RT-PCR Kit (Invitrogen) yang terdiri dari:
 - 10 mM dNTPs
 - Water
 - 5x cDNA Synthesis buffer
 - 0.1 M DTT
 - RNase Out
 - SuperScript™ III RT
 - RNase H
- Primer (TS1-TS4) (Tabel 4)

Metode

1. Siapkan RT PCR kit dan sampel. Tunggu hingga PCR reagen mencair.

2. Siapkan PCR tube dan beri label.
3. Campurkan mastermix 1 sesuai dengan petunjuk tabel.

Tabel : Komposisi mastermix 1. Komposisi ini untuk satu reaksi PCR.

Material	Volum (μl)
Primer mix	1
10 mM dNTPs	1
Nuclease free water	7
Total volum	9

Tabel 6: Komposisi mastermix 2

Material	Volum (μl)
5x FS buffer	4
0.1 M DTT	1
RNAse Out	0.5
SS III	0.5
Total volum	6

4. Pipet 9 μ l kedalam PCR tube.
5. Tambahkan 5 μ l RNA template.
6. Vortex sebentar agar merata dan Sentrifuge sebentar agar seluruh larutan berada di dasar tube.

7. Nyalakan mesin PCR dengan kondisi berikut: 65°C 5 menit.
8. Siapkan mastermix 2 sesuai dengan petunjuk tabel 6.
9. Ambil sampel dan diamkan di es selama 2 menit.
10. Tambahkan mastermix 2 kedalam sampel.
11. Campur dan sentrifuge singkat agar seluruh larutan berada di dasar tube.
12. Masukkan pada mesin PCR dan jalankan dengan kondisi 50°C selama 60 menit kemudian 85°C selama 5 menit.
13. Tambahkan 1 µl RNase H dan jalankan mesin PCR dengan suhu 37°C selama 30 menit.
14. Simpan cDNA pada -30°C.

PCR SEROTYPING DENGUE

Teknik PCR ini digunakan untuk mendeteksi serotipe virus dengue. Perbedaan serotipe dapat diketahui sesuai dengan ukuran produk PCR atau pita DNA yang dihasilkan .

Dibawah ini diberikan contoh pelaksanaan teknik PCR dengan rTaq (recombinant Taq) DNA Polymerase (Toyobo) dan GoTaq (Promega).

PENTING

- Pastikan Suhu annealing tidak lebih besar dari suhu T_m primer.
- Waktu extension harus mengacu pada ukuran produk PCR. 1 menit untuk 1 kb.
- Persiapan reagen PCR harus dengan es atau cooler pack.

Sampel

- cDNA virus dengue

Peralatan

- Mesin PCR
- Sentrifuge
- Ice block
- mikropipet

Material

- PCR kit
- Primer (D1, Ts1-Ts4)
- Nuclease free water

Metode

1. Siapkan PCR kit dan sampel. Tunggu hingga PCR reagen mencair.
2. Siapkan PCR tube dan beri label.
3. Siapkan mastermix sesuai dengan petunjuk tabel dibawah ini. Tabel 7 untuk rTaq dan tabel 8 untuk GoTaq.

Tabel 7: Komposisi mastermix rTaq (Toyobo).

Material	Volum (μl)
10 x rTaq buffer	2
10 mM dNTPs	2
Primer mix (D1, Ts1-Ts4)	2 @0.4
r-Taq	0.1
Nuclease free water	9
Total volum	15.1

Tabel 8: Komposisi mastermix GoTaq (Promega).

Material	Volum (μl)
GoTaq mastermix	12.5
Primer mix (D1, Ts1-Ts4)	1 @0.2
Nuclease free water	6.5
Total volum	20

Tabel 9: Kondisi PCR

Langkah	Suhu (°C)	Waktu (menit)	Siklus (x)
Initial denaturation	95	5	1
Denaturation	95	1	
Annealing	50	1	35
Extension	72	1	
Final extension	72	10	1
Hold	4	∞	1

4. Vortex dan Sentrifuge sebentar agar seluruh larutan berada di dasar tube.
5. Masukkan 15.1 µl mastermix (rTaq) atau 20 µl mastermix (GoTaq) kedalam tube PCR.
6. Tambahkan 5 µl template cDNA.
7. Gunakan vortex untuk mencampur mastermix dan sampel.
8. Sentrifuge sebentar agar seluruh larutan berada di dasar tube.
9. Siapkan mesin PCR sesuai dengan kondisi pada tabel 9:
10. Masukkan tube PCR kedalam mesin dan jalankan dengan kondisi tersebut.

11. Setelah selesai produk PCR dapat segera divisualisasi dengan elektroforesis gel agarose atau disimpan pada suhu 4°C.

ELEKTROFORESIS GEL AGAROSE

Elektroforesis Gel agarose adalah teknik yang umum digunakan pada bidang biokimia dan biologi molekuler untuk mendeteksi dan memisahkan fragmen DNA [15].

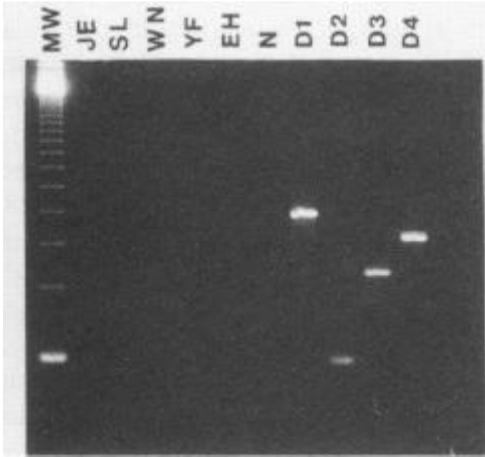
Ukuran fragmen DNA yang dipisahkan beragam mulai dari 50 bp sampai dengan 25 kb.

Beberapa macam reagen dapat digunakan untuk visualisasi fragmen DNA. Salah satu yang paling umum digunakan adalah EtBr.

Adapun demikian EtBr merupakan bahan kimia mutagen dan karsinogen. Maka dari itu penggunaannya harus hati hati dan mendapatkan pelatihan. Reagen alternative untuk staining antara lain Syber Gold, Syber Green, Crystal violet, dan Methyl blue.

Crystal violet dan methyl blue tidak memerlukan paparan sinar UV akan tetapi sensitivitasnya lebih rendah dari EtBr.

Adapun SYBER Gold dan SYBER green memiliki sensitivitas yang tinggi tetapi memiliki harga yang jauh lebih mahal dari EtBr.



Gambar 10: Hasil agarose gel serotipe virus dengue. D1 –D4 adalah serotype dengue 1 sampai 4. MW adalah marker 100 bp. [14]

Dilihat dari sisi ekonomi, sensitivitas, dan kemudahan penggunaan EtBr menjadi salah satu pilihan ideal bagi para peneliti dan analis laboratorium [16].

Gambar 10 adalah contoh tipikal hasil visualisasi agarose dengue serotipe 1 – 4 dengan menggunakan metode PCR yang telah dijelaskan sebelumnya.

PENTING

- **Rasio Sampel dan Loading Dye adalah 1:1**
- **Visualisasi DNA dengan sinar Uv tidak boleh terlalu lama, karena sinar UV dapat mendegradasi DNA**

Pembuatan Gel Agarose

Peralatan

- Tabung erlemeyer
- Sendok
- Balance
- Gelas ukur
- Microwave
- Cetakan gel Agarose

Material

- Buffer TAE 0.5x
- Bubuk Agarose
- Kertas timbang

Metode

1. Siapkan tabung erlemeyer, sendok, kertas timbang, dan bubuk agarose.
2. Nyalakan balance.
3. Letakkan kertas timbang dan tekan tombol TARE untuk membuat timbangan menunjukkan angka 0 gr.
4. Timbang agarose sebanyak 1.5 gr.
5. Masukkan agarose kedalam tabung erlemeyer.
6. Dengan bantuan gelas ukur, tambahkan buffer TAE 0.5x sebanyak 100 ml.
7. Goyangkan agar campuran merata kemudian masukkan kedalam microwave.
8. Nyalakan microwave sampai cairan mendidih.
9. Siapkan cetakan gel agarose
10. Setelah itu tuangkan larutan ke cetakan. Jangan lupa memasang cetakan sumuran (sisir).
11. Tunggu hingga larutan agarose padat. Setelah Gel terbentuk bisa langsung digunakan atau disimpan dalam buffer TAE 0.5X di dalam kulkas.

Persiapan Larutan Staining

Peralatan

- Kotak Kontainer
- Shaker

Material

- Buffer TAE 0.5x
- Ethidium Bromide (EtBr)

Metode

1. Tambahkan Buffer TAE 0.5x kedalam kotak container.
Volum menyesuaikan dengan besar kotak container.
2. Tambahkan EtBr dengan konsentrasi akhir 0.5 µg/ml.
3. Letakkan kotak container pada shaker.

Elektroforesis Gel Agarose

Peralatan

- Mikropipet (0-20 µl)
- Electrophoresis chamber

Material

- Buffer TAE 0.5x
- Staining solution (buffer TAE 0.5x + Etbr)
- Loading dye 6x
- DNA ladder 100 bp
- Kertas parafilm
- Gunting

- Pipet tips (white or yellow)

Metode

1. Siapkan electrophoresis chamber dan tuangkan buffer TAE 0.5x.
2. Masukkan gel agarose dan pastikan seluruh gel terendam buffer TAE 0.5x.
3. Potong kertas parafilm sesuai dengan kebutuhan.
4. Pipet 1 μ l loading dye ke kertas parafilm. Total jumlah sesuai dengan banyaknya sampel dan ladder.
5. Tambahkan 5 μ l sampel ke loading dye. Campurkan dengan pipet agar merata.
6. Sedangkan untuk DNA ladder tambahkan 3 μ l ke loading dye dan 2 μ l buffer TAE 0.5x.
7. Masukkan sampel dan DNA ladder sejumlah 6 μ l kedalam sumuran gel agarose.
8. Nyalakan Electrophoresis chamber dengan kondisi 100 v.
9. Tunggu kira kira selama 35 menit.
10. Setelah itu pastikan bahwa sampel sudah siap untuk staining dengan melihat warna kuning berada pada garis kedua.
11. Angkat gel agarose dan masukkan kedalam staining solution selama 30 menit.
12. Ambil gel untuk visualisasi sampel dengan uv menggunakan Gel Doc.

13. Bandingkan sampel dengan DNA ladder.

DAFTAR PUSTAKA

- [1] R.-H. Carlos Omar *et al.*, “Cell Culture: History, Development and Prospects,” *Int. J. Curr. Res. Acad. Rev.*, vol. 3, no. 1, pp. 252–263, 2015.
- [2] O. O. Oyeleye, S. T. Ogundeji, S. I. Ola, and O. G. Omitogun, “Basics of animal cell culture : Foundation for modern science,” vol. 11, no. May, pp. 6–16, 2016.
- [3] K. R. . Singh, “Cell cultures derived from larvae of *Aedes Albopictus* (Skuse) and *Aedes Aegypti* (L.),” *Source Curr. Sci.*, vol. 36, no. 19, pp. 506–508, 1967.
- [4] A. Igarashi, “Isolation of a Singh’s *Aedes albopictus* cell clone sensitive to dengue and Chikungunya viruses,” *J. Gen. Virol.*, vol. 40, no. 3, pp. 531–544, 1978.
- [5] Public Health England, “Cell line profile Vero,” *Eur. Collect. Authenticated Cell Cult.*, no. 84113001, pp. 1–2, 2016.
- [6] Sigma-Aldrich, *Fundamental techniques in cell culture*, 3rd ed. 2016.
- [7] M. G. Guzman *et al.*, “Dengue: a continuing global threat,” *Nat. Rev. Microbiol.*, vol. 8, no. 12, pp. S7–S16, 2010.

- [8] J. J. Martinez-Barragan and R. M. del Angel, "Identification of a putative coreceptor on Vero cells that participates in dengue 4 virus infection," *J Virol*, vol. 75, no. 17, pp. 7818–7827, 2001.
- [9] A. H. Coons, H. J. Creech, and R. N. Jones, "Immunological Properties of an Antibody Containing a Fluorescent Group.," *Exp. Biol. Med.*, vol. 47, no. 2, pp. 200–202, 1941.
- [10] L. Boudreau, "Principles of Immunohistochemistry Queen's Laboratory For Molecular Pathology," p. 12, 2011.
- [11] M. G. Guzman *et al.*, "Dengue : a continuing global threat Europe PMC Funders Author Manuscripts," *Nat Rev Microbiol*, vol. 8, no. 12 0, pp. S7–16, 2010.
- [12] W. M. Freeman, S. J. Walker, and K. E. Vrana, "Quantitative RT-PCR: Pitfalls and potential," *BioTechniques*, vol. 26, no. 1. pp. 112–125, 1999.
- [13] C. F. dos Santos, V. T. Sakai, M. A. de A. M. Machado, D. N. Schippers, and A. S. Greene, "Reverse transcription and polymerase chain reaction: principles and applications in dentistry," *J. Appl. Oral Sci.*, vol. 12, no. 1, pp. 1–11, 2004.
- [14] R. S. Lanciotti, C. H. Calisher, D. J. Gubler, G. J. Chang, and A. V. Vorndam, "Rapid detection and typing of dengue

viruses from clinical samples by using reverse transcriptase-polymerase chain reaction,” *J. Clin. Microbiol.*, vol. 30, no. 3, pp. 545–551, 1992.

[15] J. Sambrook and D. W. Russell, *Molecular Cloning - Sambrook & Russel*, vol. 18. 2001.

[16] P. Y. Lee, J. Costumbrado, C.-Y. Hsu, and Y. H. Kim, “Agarose Gel Electrophoresis for the Separation of DNA Fragments,” *J. Vis. Exp.*, no. 62, pp. 1–5, 2012.

TIM PENULIS



Ilham Harlan Amarullah, BSc.

Kelompok Studi Dengue



Teguh Hari Sucipto, S.Si., M.Si.

Kelompok Studi Dengue



Siti Churrotin, S.Si.

Kelompok Studi Dengue

KONTAK

Kelompok Studi Dengue

Lembaga Penyakit Tropis Universitas Airlangga

www.itd.unair.ac.id/dengue

Alamat :Kelompok Studi Dengue, Lembaga Penyakit Tropis

Universitas Airlangga, Mulyorejo Kampus C, Surabaya.

Telp. 0853 3505 0852

Email korespondensi: amarullah@staf.unair.ac.id