

## REPLIKASI VIRUS DENGUE PADA KULTUR SEL ENDOTEL PEMBULUH DARAH KELINCI

*(Replication of Dengue Virus in the Rabbit Vascular Endothelial Cells Culture)*

Ni Luh Eka Setiasih

*Laboratorium Histologi, Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Udayana.*

### ABSTRAK

Infeksi virus Dengue (DEN) dapat menyebabkan *dengue hemorrhagic fever –dengue shock syndrome* (DHF-DSS), yang ditandai dengan kebocoran plasma dan gangguan hemostasis. Meskipun sel endotel dipertimbangkan dapat menjadi target sel pada patogenesis DHF, namun sedikit bukti yang menyatakan infeksi virus dengue menyebabkan perubahan fungsi sel endotel. Dalam studi ini sel endotel diisolasi dari aorta desenden thoraxis-abdominalis kelinci, kemudian dilakukan kultur sel primer. Kultur sel kemudian diinokulasi dengan virus Dengue DEN-1, -2, -3, -4, dan DEN-mix. Replikasi virus dengue pada kultur sel endotel diukur dengan uji *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA). Titer Ag (DEN-1, -2, -3, -4, dan DEN-mix) yang didapat dari supernatan bervariasi. Dengue tipe 2 mempunyai titer paling tinggi dibandingkan dengan DEN-mix dan tipe virus dengue lainnya. Kerusakan sel endotel menyebabkan kebocoran vaskuler yang berperan pada patogenesis infeksi virus dengue. Hasil tersebut menyiratkan kemungkinan kerusakan sel endotel disebabkan oleh infeksi virus dengue yang mengakibatkan kebocoran vaskuler.

Kata kunci : virus dengue, replikasi. kultur sel endotel, ELISA.

### ABSTRACT

The severe outcome of the Dengue (DEN) virus infection known as DEN hemorrhagic fever – DEN shock syndrome (DHF – DSS), is characterized by plasma leakage and hemostasis derangements. Although endothelial cells have been speculated to be a target in the pathogenesis of DHF, there has been little evidence on Dengue virus infection to any alteration in endothelial cell function. In this study, the endothelial cells has been isolated from rabbit thoraxis-abdominalis descendent aorta, then performed primary culture. The culture was then inoculated with virus Dengue DEN-1, -2, -3, -4 and DEN-mix. Replications of dengue virus in endothelial cells culture were demonstrated by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Ag titers found among the supernatant of DEN-1, -2, -3, -4, and DEN-mix cultures were vary. Dengue type 2 had the highest virus titers in supernatant compared with those of DEN-mix and other types. Endothelial cell damage may cause vascular leakage that contributes to the pathogenesis of Dengue infection. There results imply the possibility that the existence of endothelial cell damage caused by DV infection may cause vascular leakage.

Key words : Dengue virus, replications, endothelial cells culture, ELISA

## PENDAHULUAN

Infeksi virus Dengue pada manusia dapat bersifat subklinis maupun klinis, dengan gejala ringan berupa demam/ *flu-like syndrome* atau *Dengue Fever* (DF). Pada kasus, DF sendiri sifatnya terbatas dan jarang fatal. Namun, hal ini menjadi berisiko bila infeksi virus Dengue berkembang menjadi *Dengue Hemorrhagic Fever* (DHF) atau *Dengue Shock Syndrome* (DSS) dapat menimbulkan kematian. DHF terjadi akibat abnormalitas hemostasis dan meningkatnya permeabilitas vaskuler yang secara karakteristik ditandai dengan kebocoran kapiler, trombositopenia dan hypovolamik syok (Leitmayer, *et. al.*, 1999; Huang, *et. al.*, 2000).

Patofisiologi utama yang menentukan beratnya penyakit dan membedakan DHF dengan DF adalah meningkatnya permeabilitas dinding pembuluh darah, menurunnya volume plasma, terjadinya hipotensi, trombositopenia dan diatesis hemoragik (Soedarmo, 1995). Dua perubahan patofisiologis yang utama pada DHF adalah peningkatan permeabilitas pembuluh darah dan gangguan hemostasis yang mekanismenya belum diketahui (WHO, 1998; Bosche. *al.*, 2002). Peningkatan permeabilitas kapiler pada infeksi virus dengue yang berat menimbulkan dugaan bahwa sel endotel kapiler berperan langsung terhadap terjadinya kebocoran pembuluh darah dan perdarahan yang terjadi pada DHF/DSS (Halstead, 1989).

Mekanisme patofisiologis, patogenesis, hemodinamika dan biokimia DHF belum diketahui secara pasti (Soedarmo, 1995). Penelitian menggunakan kultur sel

endotel merupakan salah satu cara untuk mengetahui kemampuan replikasi virus dengue pada sel tersebut maupun perubahan sel endotel pada infeksi virus dengue. Pengetahuan patogenesis DHF adalah suatu masalah yang sangat penting pada penelitian virus dengue, karena mengarah langsung pada efektivitas perlakuan pada pasien DHF dan cara pencegahan penyakit (Kurane dan Ennis, 1997).

Patogenesis infeksi virus Dengue, sampai saat ini sedikit diketahui, demikian pula halnya mengenai informasi dasar-molekuler tentang pengikatan virus Dengue pada sel target. Awal perlekatan virus pada sel target terjadi melalui *critical determinant* dari sel dan tropismus jaringan. Selain itu, juga merupakan hasil penginteraksian antara molekul reseptor ectodomain viral dengan koreseptor yang diekspresikan pada permukaan sel target. Perlekatan virus pada sel yang mengekspresikan reseptor Fc seperti monosit terjadi pada bagian reseptor Fc domain antibodinya. Mekanisme infeksi tersebut tidak dapat menjelaskan infeksi primer yang terjadi pada pasien tanpa antibodi Dengue dan infeksi pada sel nonfagositik yang tidak mengekspresikan reseptor Fc (Wimmer, 1994; He, 1995). Untuk hal tersebut banyak penelitian telah dilakukan. Chen, *et al.* (1996) menunjukkan, bahwa pada infeksi primer virus Dengue terjadi interaksi antara protein envelope virus Dengue dengan sel target, yang merupakan dasar molekuler yang kuat. Hal ini sangat penting untuk mengetahui potensial infektivitas interaksi tersebut

Meskipun protein envelope virus Dengue memegang peranan penting dalam

menentukan daya infektifitasnya pada sel target, namun nampaknya sifat tersebut tidak sama pada semua sel target dan sangat tergantung pada virulensi masing-masing serotipe virus Dengue. Hal ini terbukti bahwa tingkat pengikatan virus Dengue pada sel vero dan hepatoma berbeda, karena sel hepatoma terbukti lebih peka dibandingkan dengan sel vero (Marienneau, *et.al.*, 1996).

Sel endotel merupakan salah satu sel target virus Dengue. Adanya variasi serotipe virus Dengue dengan reseptor sel dan sel target tentunya terdapat perbedaan reseptor spesifik DHF yang diekspresikan oleh sel endotel pembuluh darah dibandingkan dengan sel lainnya. Infeksi berbagai serotipe virus Dengue pada sel endotel juga akan memberikan gambaran daya replikasi yang berbeda-beda (Bosch, *e. al.*, 2002; Lin, *el al.*, 2003).

Seperti telah dijelaskan bahwa patogenesis infeksi virus Dengue belum banyak diketahui, demikian pula infeksi pada sel endotel. Mengingat peranan sel ini sangat besar dalam memberikan kontribusi timbulnya manifestasi klinis DHF maka penelitian ini menjadi sangat penting untuk dilakukan.

## METODE PENELITIAN

### Isolat Virus Dengue

Sampel virus merupakan hasil isolasi Lab. Dengue TDC-Unair dan isolat dari US-NAMRU-2 Jakarta. Virus ini diisolasi dengan menggunakan sel C6/36p27 berasal dari NAMRU-2 Jakarta.

### Serum

Serum sampel diambil dari pasien DHF dengan derajat sakit yang berbeda dari yang akut sampai sembuh dari DHF.

Sampel tersebut berasal dari beberapa rumah sakit yang ada di Indonesia.

Sampel yang digunakan adalah serum yang telah dititrasi dan yang memiliki titer antibodi tertinggi, direaksikan dengan antigen spesifik virus Dengue, sehingga dapat diketahui titer virus Dengue pada kultur sel endotel pembuluh darah arteri.

### Kultur sel endotel

Bahan utama yang digunakan adalah aorta dan arteri yang diambil dari kelinci yang berumur sekitar 2 bulan. Kelinci dieutanasi, dibuka kulit pada bagian thoraks, kemudian dicari dan diambil aorta desenden thoraks sampai ke abdominalis. Bahan sampel yang telah diambil kemudian dimasukkan ke dalam botol yang mengandung *phosphate buffer salin* (PBS) dan selanjutnya dilakukan isolasi sel endotel.

Isolasi sel endotel dilakukan secara enzimatis dari aorta kelinci tersebut kemudian dikultur dalam 2 ml RPMI 1640/ M 199 (mengandung 2 mmol L-glutamate, 100 IU/ml Penicillin, 100 mg/ml Streptomycin, 2,5 mg/ml Fungizone dan 30 % serum manusia) dan dimasukkan ke dalam cawan polystyrene diameter 3,5 cm yang dasarnya telah dilapisi dengan 0,5 % kolagen. Kultur sel dilakukan pada ruangan yang memiliki kelembaban udara 95 % dan 5 % karbon dioksida. Setelah 24 jam sel-sel yang tidak melekat dibuang dan penggantian medium dilakukan setiap hari. Pengamatan dan penghitungan hasil kultur sel dilakukan di bawah inverted microscope setiap 2 hari setelah penyemaian. Setelah terbentuk sel-sel yang *confluent* selanjutnya dilakukan

pemanenan dengan menggunakan 0,05% tripsin dan 0,02% EDTA dengan rasio 1 : 3. Setelah dilakukan pasase 3 kali dengan jalan mengambil sekitar  $2 \times 10^6$  untuk kemudian dikultur dalam cawan polystyrene yang telah dilapisi dengan 0,5 % kolagen, untuk digunakan dalam penelitian/pemeriksaan lebih lanjut.

### Inokulasi Virus Dengue

Virus Dengue diinokulasikan pada kultur sel endotel pembuluh darah arteri yang telah dipasase sebanyak 3 kali. Kultur sel endotel dibagi menjadilima kelompok. Dari koleksi sel endotel monolayer primer diambil sebanyak  $1-2 \times 10^6$  /well dari 96-well plate tissue-culture. Setelah diinkubasikan selama semalam dan terbentuk sel endotel *monolayer confluent* kemudian masing-masing kelompok dipapar dengan virus Dengue DEN-1, -2, -3, -4 dan DEN-mix. Dosis inokulasi adalah MOI (*multiplicity of infection*). Masing-masing kelompok dipapar virus Dengue sebanyak jumlah sel/ ml kali MOI dibagi titer virus kali pengenceran. Pemaparan virus Dengue dikerjakan sesuai prosedur dari Deubel dan Depres (1997) yaitu pada tiap sumuran medium kultur ditambah virus sesuai dengan kelompok penelitian sehingga volume seluruhnya 0,5 ml. Kultur dimasukkan ke dalam inkubator 37°C, 5% CO<sub>2</sub> selama 1 jam. Kemudian ditambahkan medium kultur sampai volumenya 1 ml. Selanjutnya dilakukan observasi mengenai daya replikasi pada sel endotel setelah diinokulasi dengan masing-masing serotipe virus Dengue. Observasi dilakukan 2 jam, 4 jam, 8 jam, 24 jam, 48 jam dan 72 jam postinokulasi.

### Daya replikasi virus Dengue

Daya replikasi masing-masing serotipe virus Dengue (DEN-1, 2, 3, 4, dan mix) dapat diketahui dengan memeriksa titer antigen/virus yang diambil dari supernatan masing-masing kultur sel endotel yang terpapar dengan semua serotipe virus tersebut. Pemeriksaan dilakukan dengan menggunakan metode ELISA, yaitu *Double Sandwich* ELISA (Rantam, 2003).

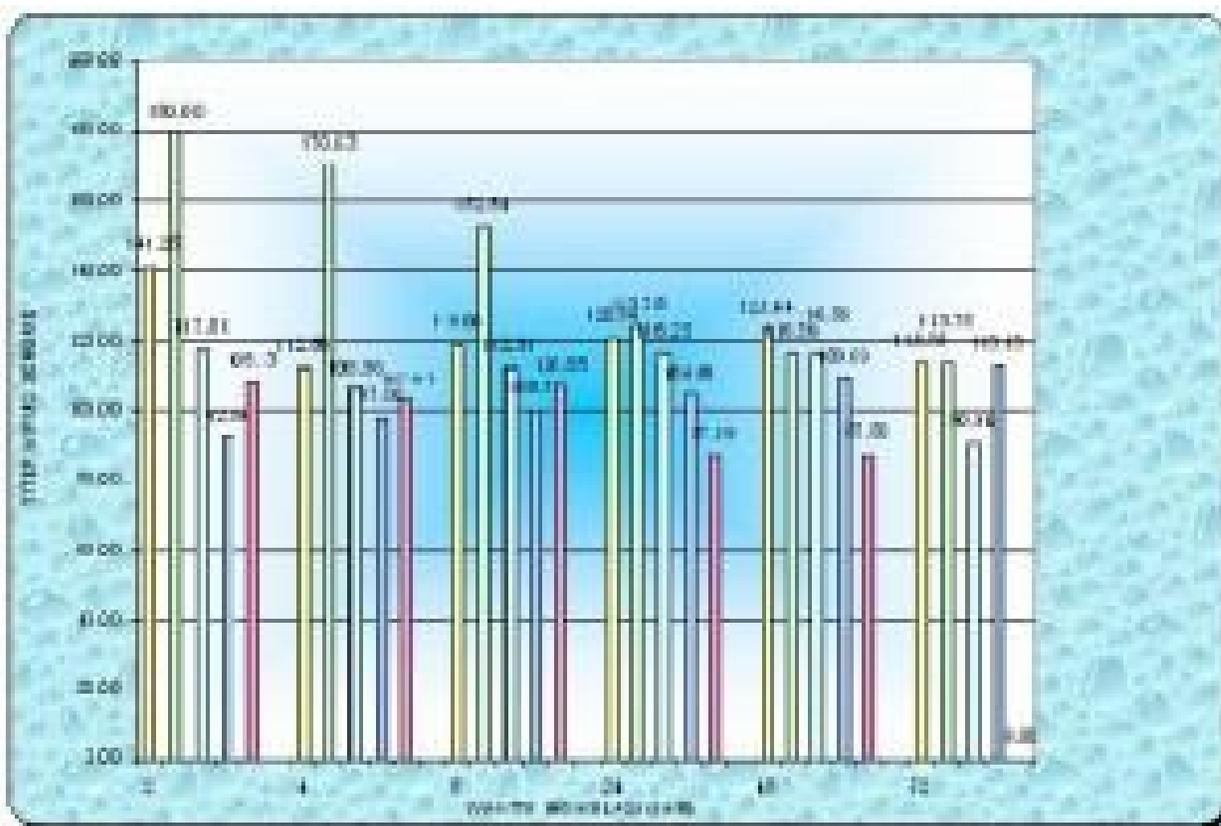
*Double Sandwich* ELISA ini menggunakan 3 macam perangkat antibodi. Antibodi pertama merupakan antibodi poliklonal terhadap virus Dengue yang dilapiskan pada mikroplate, untuk selanjutnya direaksikan dengan antigen yang dideteksi. Setelah dilakukan pencucian ditambahkan antibodi kedua yaitu antibodi yang berasal dari serum pasien penderita DHF dan akhirnya direaksikan dengan antibodi ketiga yaitu konjugat. Pengamatan hasil dilakukan dengan menggunakan ELISA reader setelah penambahan substrat dan stop reaksi. Sampel yang digunakan untuk mendeteksi titer antigen virus Dengue berupa supernatan dari masing-masing kultur sel endotel yang telah diinfeksi dengan berbagai jenis serotipe virus Dengue tersebut.

### HASIL DAN PEMBAHASAN

Untuk mengetahui daya replikasi dari masing – masing serotipe virus Dengue pada kultur sel endotel pembuluh darah adalah dengan mengukur titer virus tersebut dengan *Double Sandwich* ELISA. Hasil dari pengamatan tersebut dapat dilihat pada tabel 1 berikut :

Tabel 1 : Hasil pengamatan daya replikasi masing – masing serotipe virus Dengue dengandouble sandwich ELISA

	2 jam	4 jam	8 jam	24 jam	48 jam	72 jam
DEN-1	141,25	112,50	119,06	120,94	123,44	113,75
DEN-2	180,00	170,63	152,81	123,75	116,56	113,75
DEN-3	117,81	106,56	112,81	116,25	116,56	90,94
DEN-4	92,19	97,50	100,31	104,38	109,69	113,13
DEN-Mix	108,13	102,81	106,88	87,19	87,50	-



Gambar 1. Grafik daya replikasi masing-masing serotipe virus Dengue dengan variasi waktu perlakuan yang berbeda pada kultur sel endotel pembuluh darah arteri.

Secara lebih jelas mengenai daya virulensi virus Dengue pada kultur sel endotel pembuluh darah untuk masing-masing serotipe dan variasi waktu perlakuan yang diberikan dapat dilihat pada Gambar 1 berikut ini :

Berdasarkan hasil uji ELISA menunjukkan, bahwa daya replikasi virus Dengue antara masing-masing perlakuan memberikan gambaran yang berbeda-beda satu sama lainnya. Hal ini menunjukkan bahwa kemampuan dari masing-masing serotipe virus tersebut untuk melakukan replikasi pada kultur sel endotel pembuluh darah berbeda-beda antara satu dengan yang lainnya. Perbedaan tersebut erat kaitannya dengan tingkat virulensi dari masing-masing serotipe virus tersebut. Perbedaan ini terjadi karena masing-masing serotipe virus Dengue memiliki variasi genetik yang akan sangat mempengaruhi kemampuannya untuk melakukan perlekatan, inisiasi, dan replikasi pada sel target.

Dari ke lima perlakuan yang diberikan pada kultur sel endotel menunjukkan bahwa DEN-1, DEN-3 dan DEN-mix memberikan gambaran yang hampir sama yaitu pada 2 jam setelah infeksi masing-masing serotipe virus Dengue menghasilkan titer antigen virus lebih tinggi dibandingkan dengan 4 jam setelah infeksi. Hal ini disebabkan proses perlekatan virus Dengue pada ke-3 perlakuan di atas belum terjadi sepenuhnya sehingga pada waktu pengambilan medium kultur yang digunakan untuk mengetahui titer antigennya ikut terambil.

Pada inokulasi DEN-1 dan DEN-3 menunjukkan kenaikan titer antigen virus mencapai puncaknya 48 jam untuk kemudian turun 72 jam setelah inokulasi, sementara untuk DEN-mix naik turunnya titer antigen virus terjadi sangat bervariasi antara masing-masing perlakuan waktu yang diberikan. Hal ini karena kecepatan virus untuk melakukan replikasi pada perlakuan tersebut memiliki pola yang berbeda dibandingkan dengan ke-4 perlakuan lainnya.

Infeksi virus Dengue DEN-4 memperlihatkan bahwa, serotipe virus ini memiliki kecepatan untuk melakukan ikatan dengan kultur sel endotel lebih cepat bila dibandingkan dengan ke-3 perlakuan di atas (DEN-1, DEN-3 dan DEN-mix). Hal ini terlihat dari gambaran grafik yang ditunjukkan yaitu terjadi peningkatan titer antigen virus pada 4 jam setelah infeksi dan terus meningkat sampai 72 jam selanjutnya.

Infeksi virus Dengue DEN-2 menunjukkan, bahwa titer antigen yang terdeteksi pada supernatan sudah tinggi pada 2 jam setelah infeksi untuk kemudian terus turun sampai 72 jam setelah infeksi. Dari grafik menunjukkan bahwa titer virus pada perlakuan ini paling tinggi dibandingkan dengan lainnya, yang menunjukkan bahwa kemampuan virus ini untuk melakukan replikasi dan melepaskannya paling cepat dibandingkan yang lainnya. Hal ini dapat terjadi mengingat serotipe virus Dengue ini memiliki kemampuan virulensi yang berbeda pada sel target. Leitmayer, *et al.* (1999) menyatakan bahwa infeksi primer DEN-2 dapat memberikan manifestasi klinis *Dengue fever* (DF) atau *Dengue hemorrhagic fever* (DHF), hal ini

dipengaruhi oleh variasi genetik yang dimiliki oleh virus tersebut sewaktu menginfeksi hospes. Turunnya titer virus sampai 72 jam setelah inokulasi menunjukkan semakin banyaknya sel-sel endotel yang mengalami kerusakan sehingga mempengaruhi titer virus yang dihasilkan

Hasil penelitian di atas menunjukkan keadaan yang sama dengan penelitian yang dilakukan oleh Bunyaratvej *et al.*(1997) yang menyatakan, bahwa replikasi virus dengue (type 1, 2, 3, dan 4) pada sel endotel manusia secara *in vitro* dapat diketahui dengan mengukur titer virusnya. Hasil penelitiannya menunjukkan bahwa titer virus terus meningkat dan mencapai puncaknya pada 6 hari setelah infeksi, untuk kemudian menurun sampai sama dengan titer sewaktu diinokulasikan pada 14 hari setelah infeksi. Infeksi virus Dengue pada sel endotel juga mengakibatkan meningkatnya proliferasi dan mitosis sel endotel secara nyata.

Perbedaan hasil penelitian yang didapat karena kultur sel endotel yang digunakan dalam penelitian ini berbeda. Kultur sel endotel yang digunakan dalam penelitian ini berasal dari pembuluh darah kelinci sehingga respon yang diberikannya juga berbeda.

#### SIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian menunjukkan bahwa: terdapat variasi daya replikasi antara masing-masing serotipe virus Dengue pada kultur sel endotel pembuluh darah kelinci.

#### UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis menyampaikan terima kasih yang tidak terhingga kepada: Prof. Dr. Fedik Abdul Rantam, drh. dan Dr. Bambang Sektiari L., DEA, drh atas bimbingan dan saran yang diberikan.

#### DAFTAR PUSTAKA

- Bosch, I.; K. Xhaja; L. Estevez; G. Raines; H. Melichar; R.V. Warke; M.V. Fournier; F.A. Ennis; A.L. Rothman. 2002 : Increased production of interleukin-8 in primary human monocytes and in human epithelial. *J. Virol.* Jun;76(11): 5588-5597.
- Bunyaratvej, A.; P. Butthep; S. Yoksan; N. Bhamarapavati. 1997 : Dengue viruses induce cell proliferation and morphological changes of endothelial cells. *J. Med.* 28(3) :32-37.
- Chen, Y.; T. Maguire; R.M. Mark. 1996. Demonstration of binding of envelope protein to target cells. *J. Virol.* 70:8765-8772.
- Deubel, V.; P. Depres. 1997 : Current protocols workshop on molecular Biology of Dengue Virus . Institute Pasteur, France.
- Halstead, S.B. 1998 : Antibody, macrophages, Dengue virus infection, shock, and hemorrhage: a pathogenetic cascade. *Rev. Infect. Dis.* 11 (Suplemen 4): S830-S839
- He, R.T. 1995 : Antibodies the block virus attachment to vero cells are major component of the human neutralizing antibody respons against dengue virus type 2. *J. Med. Virol.* 45:451-461.
- Huang, Y.H.; H.Y. Lei; H.S. Liu; Y.S. Lin; C.C. Liu; T.M. Yeh. 2000 : Dengue virus infects human endothelial cells and induces IL-6 and IL-8 production. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* Jul-Aug;63(1-2):71-75.
- Kurane, I.; F.A. Ennis. 1997 : Immunopathogenesis of dengue virus infections, p. 273-290. In D.J.

- Gubler and G. Kuno (ed.), Dengue and dengue hemorrhagic fever. CAB International London United Kingdom.
- Leitmeyer, K.C.; D.W. Vaughn; D.M. Watts; R. Salas; I.V.D. Chacon; C. Ramos; R. Rico-Hesse, 1999 : Dengue virus structural differences that correlate with pathogenesis. *J. Virol.* Jun.73(6):4738-4747.
- Lin, C.F.; H.Y. Lei; A.L. Shiau; C.C. Liu; H.S. Liu; T.M. Yeh; S.H. Chen; Y.S. Lin. 2003 : Antibodies from dengue patient sera cross-react with endothelial cells and induce damage. *J. Med. Virol.* Jan;69(1):82-90.
- Marianeau, P.; F. Merget; R. Oliver; D.M. Morens; V. Deubel. 1996 : Dengue 1 virus binding to human hepatoma HeG2 and simian Vero cell surface differs. *J. Gen. Virol.* 77:2547-2554
- Rantam, F.A. 2003 : Metode imunologi. P.82-85. Airlangga University Press, Surabaya.
- Soedarmo, S. P. 1995 Demam Berdarah Dengue. *Medika* 10 (XXI): 456-460
- WHO. 1998 : Demam Berdarah Dengue : diagnosis, pengobatan, pencegahan dan pengendalian (terjemahan). Ed. 2. EGC. Jakarta.
- Wimmer, E. 1994 : Introduction in cellular receptors for animal viruses. (ed. Wimmer) 1-13. Cold Spring Harbor Laboratory press, Cold Spring Harbor, NY.