

KARAKTERISASI DAN APLIKASI ANTIBODI MONOKLONAL WDSSB5 UNTUK DETEKSI VIRUS DENGUE PADA SEL C6/36 DENGAN METODE IMUNOSITOKIMIA

Nurminha¹, Sitti Rahmah Umniyati², Wayan T. Artama³

ABSTRAK

Demam Dengue (DD) dan Demam Berdarah Dengue (DBD) disebabkan oleh virus Dengue yang terdiri dari 4 serotype Dengue 1, 2, 3 dan 4. Manifestasi klinis infeksi virus Dengue pada manusia sangat bervariasi mulai dari asimtomatik sampai berat. Isolasi virus Dengue menggunakan kultur sel C6/36 merupakan *gold standar* untuk menegakkan diagnosis pasti infeksi virus Dengue. Team Dengue UGM telah berhasil memproduksi antibodi monoklonal terhadap virus Dengue-3 salah satunya yang berasal dari sel hibrid WDSSB5. Tujuan penelitian ini adalah untuk melakukan karakterisasi dan mengaplikasikan antibodi monoklonal WDSSB5 sebagai antibodi primer untuk mendeteksi virus Dengue dari serum pasien yang positif mengandung virus Dengue yang diisolasi pada sel C6/36 (C6/36 *cell line*) dengan metode imunositokimia *streptavidin biotin peroxidase complex* (ISBPC). Desain penelitian ini eksperimental. Pada penelitian ini propagasi sel hibridoma WDSSB5 dilakukan secara *in vitro* dan *in vivo*. Karakterisasi yang dilakukan meliputi uji klasifikasi antibodi monoklonal WDSSB5, pemeriksaan kadar protein asites WDSSB5, uji sensitivitas dan spesifitas metode imunositokimia SBPC menggunakan antibodi primer WDSSB5 serta uji spesifitas antibodi monoklonal terhadap antigen Dengue dengan Dot blot. Virus Dengue yang berasal dari serum pasien yang positif mengandung virus Dengue diinokulasi pada sel C6/36. Deteksi antigen virus Dengue dilakukan dengan menggunakan metode imunositokimia SBPC dengan antibodi monoklonal WDSSB5 sebagai antibodi primer. Kontrol positif digunakan sel C6/36 yang diinfeksi virus Dengue 1, 2, 3, 4 (prototipe) dan diinokulasi pada sel C6/36, sedangkan kontrol negatif adalah sel C6/36 yang tidak diinfeksi virus Dengue. Hasil penelitian didapatkan antibodi monoklonal WDSSB5 spesifik terhadap virus Dengue. Antibodi monoklonal WDSSB5 termasuk klas IgG dan sub klas IgG1. Kadar antibodi monoklonal WDSSB5 terkecil yang dapat mendeteksi antigen Dengue pada sel C6/36 adalah 2,2 µg/µl. Antibodi monoklonal WDSSB5 dapat diaplikasikan untuk mendeteksi virus Dengue yang berasal dari serum pasien yang positif mengandung virus Dengue yang diisolasi pada sel C6/36 dengan metode imunositokimia SPBC.

Kata kunci: Dengue , Imunitokimia SBPC, WDSSB5, Sel C6/36.

PENDAHULUAN

Penyakit Demam Dengue (DD) dan Demam Berdarah Dengue (DBD) disebabkan oleh virus Dengue yang termasuk *Arthropod Borne Virus* (*Arboviroses*) kelompok B yang dikenal sebagai genus *Flavivirus*, famili *Flaviviridae*, dan mempunyai 4 jenis serotipe, yaitu Dengue 1, Dengue 2, Dengue 3, dan Dengue 4. Infeksi virus Dengue pada manusia mengakibatkan spektrum manifestasi klinis yang bervariasi antara penyakit paling ringan

(*mild undifferentiated febrile illness*), DD, DBD, dan demam berdarah disertai syok (*dengue shock syndrome = DSS*) (Depkes RI, 1999; Soegijanto, 2006).

Penyakit Dengue merupakan masalah kesehatan global karena infeksi virus Dengue dapat menimbulkan epidemi. Diperkirakan terdapat sekurang-kurangnya 100 juta kasus DD dan 500 ribu kasus DBD dengan angka kematian rata-rata sekitar 5% (25 ribu orang) terjadi di dunia setiap tahunnya (WHO SEARO, 2003).

-
1. Politeknik Kesehatan Kemenkes Tanjungkarang Jurusan Analis Kesehatan;
 2. Bagian Parasitologi Fakultas Kedokteran Universitas Gadjah Mada;
 3. Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Gadjah Mada

Virus Dengue tersebar di seluruh dunia, dengan serotipe-serotipe semakin bercampur mengikuti mobilitas manusia. Semua serotipe masih endemis di Indonesia dan dari ke empat macam virus Dengue tersebut, virus Dengue 3 merupakan serotipe dominan di Indonesia, disusul Dengue 2, Dengue 1 kemudian Dengue 4. Virus Dengue 2 dan Dengue 3 masih merupakan serotipe yang banyak berhubungan dengan kasus-kasus yang berat. Virus Dengue 3 merupakan serotipe dominan di daerah Jawa sedangkan Dengue 2 lebih dominan di Medan. Serotipe virus yang paling sering menyebabkan syok adalah Dengue 2 diikuti oleh Dengue 3, Dengue 4 dan Dengue 1 (Listiyarningsih, 2004; Sutaryo, 2004).

Jumlah kasus DBD di Indonesia selama tahun 2006 sampai 2008, adalah sebagai berikut: tahun 2006 terdapat 106.425 kasus DBD, dengan kematian sebanyak 1.132 dan *Case Fatality Rate* (CFR) DBD sebesar 1,06 %. Pada Tahun 2007 terdapat 188.115 kasus dengan kematian mencapai 1.599 dan CFR sebesar 1,01%, sedangkan pada tahun 2008 terdapat 101.656 kasus, dengan kematian sebanyak 737 dan CFR sebesar 0.73% (WHO, 2008).

Diagnosis awal DBD menurut pedoman WHO secara umum ditegakkan berdasarkan kriteria klinis dan laboratoris dengan pemeriksaan jumlah trombosit dan kadar hematokrit (WHO SEARO, 2003). Perkembangan selanjutnya dilakukan pemeriksaan laboratorium penunjang untuk penentuan antibodi dengan uji hemaglutinasi inhibisi atau deteksi IgM dan IgG anti dengue, tetapi hasil positif dibutuhkan interval waktu karena IgM baru positif setelah hari kelima juga hasil positif dapat dideteksi sampai beberapa bulan (Wuryarningsih, 2007). Imunoglobulin M (IgM) juga dapat bereaksi silang terhadap beberapa flavivirus lain seperti *Japanese encephalitis* (JE), *St Louis encephalitis*, *Yellow fever* dan *Chikungunya* (Buchy et al., 2006).

Perjalanan penyakit DBD sangat cepat, sehingga jika tidak segera mendapatkan penanganan yang tepat, sering berakibat fatal. Sampai saat ini diagnosis DBD di Indonesia terutama

masih berdasarkan diagnosis klinis tanpa diikuti konfirmasi diagnosis virologis. Konfirmasi virologis sebenarnya dapat dilakukan sejak dini, sebab viremia terjadi dua hari sebelum demam dan selama demam. Perangkat diagnostik untuk maksud tersebut sampai saat ini belum tersedia (Umniyati et al., 2003).

Uji imunokromatografi (ICT) yang telah tersedia hanya mendeteksi IgM dan IgG saja, padahal IgM baru muncul 3-5 hari setelah demam. Pada kurun waktu ini biasanya penderita DBD berangsur sembuh atau terjadi syok bahkan meninggal dunia, sehingga kit ini lebih tepat untuk keperluan riset atau surveilensi daripada untuk penanganan pasien. Diagnostik untuk deteksi dini infeksi Dengue dapat dilakukan dengan antibodi monoklonal untuk mendeteksi antigen Dengue yang beredar di darah, sebab viremia biasanya telah terjadi 2 hari sebelum demam dan mencapai puncaknya pada saat demam. Antibodi monoklonal spesifik terhadap virus Dengue sangat diperlukan sebagai salah satu reagen diagnostik (Umniyati, et al., 2003).

Beberapa pemeriksaan laboratorium yang dapat dilakukan untuk konfirmasi infeksi virus Dengue adalah isolasi virus, deteksi genom virus menggunakan teknik *Polymerase Chain Reaction* (PCR), serta deteksi antigen virus (Aryati, 2006).

Isolasi virus merupakan baku emas (*gold standard*) untuk menegakkan diagnosis pasti infeksi virus Dengue, yang menggunakan kultur sel. Kultur sel yang banyak digunakan adalah sel AP/61 (*Ae.pseudoscutellaris*), C6/36 (*Ae.albopictus*) dan TRA-284 (*Toxorhynchites amboinensis*). Hasil kultur biasanya diidentifikasi dengan menggunakan teknik imunofluoresen DFA (*Direct Immunofluorescent Assay*) atau IFA (*Indirect Immunofluorescent Assay*). Meskipun merupakan cara terbaik untuk memastikan infeksi virus Dengue, metode ini memerlukan peralatan laboratorium yang canggih, dan memerlukan waktu yang lama (Aryati, 2006). Namun keuntungan dari melakukan isolasi virus Dengue yang berasal dari serum pasien yang positif mengandung virus Dengue pada sel C6/36 yaitu mendapatkan isolat virus

Dengue lokal yang nantinya dapat dikembangkan untuk penelitian lebih lanjut.

Sel C6/36 merupakan klon sel turunan dari nyamuk *Aedes albopictus* yang paling banyak digunakan untuk isolasi virus Dengue. Sampel yang digunakan dapat berupa serum, plasma, *buffy coat* atau darah *heparinized* (Aryati, 2006). Igarashi (1978) melakukan isolasi virus Dengue 1, 2, 3, 4 dan virus chikungunya pada sel C6/36 dan sel yang terinfeksi diidentifikasi dengan teknik *fluorescent antibody staining*.

Pula *et al.* (2003); Osman *et al.* (2007) telah melakukan deteksi virus Dengue menggunakan RT-PCR dan isolasi virus Dengue yang berasal dari serum pasien pada kultur sel C6/36 yang dideteksi dengan *Indirect Immunofluorescence Antibody Test* (IFAT).

Metode imunositokimia dapat digunakan untuk mendeteksi virus Dengue pada berbagai organ nyamuk, jaringan parafin atau pada *buffy coat* (Umniyati *et al.*, 2008a), sedangkan pada sel C6/36 belum ada laporannya. Pemeriksaan sediaan imunositokimia dapat dilakukan hanya dengan mikroskop cahaya yang banyak tersedia di laboratorium dan tidak memerlukan ketrampilan khusus, sedangkan untuk sediaan imunofluoresen harus diperiksa di bawah mikroskop fluoresen yang mahal dan jarang tersedia di laboratorium. Kelebihan dari metode imunositokimia preparat dapat tahan lebih lama tidak perlu disimpan dalam cryofreezer dan dapat membedakan sel yang terinfeksi dan tidak terinfeksi, sedangkan dengan metode imunofluoresensi preparat tidak tahan lama bila tidak disimpan dalam cryofreezer dan hanya dapat melihat sel yang terinfeksi saja (Umniyati, 2009).

Deteksi infeksi virus Dengue menggunakan metode imunositokimia SBPC diperlukan antibodi monoklonal spesifik terhadap virus Dengue sebagai salah satu reagen diagnostik. Sehubungan dengan hal tersebut Tim Dengue UGM telah berhasil memproduksi antibodi monoklonal terhadap virus Dengue-3 strain H-87 melalui tiga kali fusi. Sel-sel hibrid

penghasil antibodi monoklonal terhadap virus Dengue telah diperoleh dari fusi I, II, dan III berturut-turut sebanyak 4 klon, 13 klon, 22 klon. Sel-sel hibrid penghasil antibodi monoklonal tersebut antara lain DSSC7, DSSE10 dan WDSSB5. Antibodi monoklonal DSSC7 telah diaplikasikan sebagai antibodi primer untuk deteksi antigen virus Dengue pada organ nyamuk *Ae. aegypti* dan pada sediaan apus darah manusia dengan metode imunositokimia SBPC mempunyai sensitivitas dan spesifisitas yang tinggi. Sedangkan sel hibrid WDSSB5 belum dikarakterisasi (Sutaryo *et al.*, 1996; Umniyati *et al.*, 2008a).

Berdasarkan uraian di atas penelitian ini bertujuan untuk melakukan karakterisasi dan mengaplikasikan antibodi monoklonal WDSSB5 untuk mendeteksi virus Dengue pada sel C6/36 dengan metode imunositokimia SBPC yang berasal dari serum pasien yang positif mengandung virus Dengue berdasarkan RT-PCR.

METODOLOGI PENELITIAN

Desain Penelitian ini eksperimental dengan rancangan studi *Posttest Control Group Design*. Waktu penelitian dimulai bulan Oktober 2009 sampai Januari 2011. Populasi dalam penelitian ini penderita demam hari pertama sampai dengan hari ke-7 yang berasal dari RSUD Penembahan Senopati Bantul Yogyakarta. Sampel diambil dengan teknik *purposif sampling* yaitu sebanyak 29 pasien yang positif mengandung virus Dengue berdasarkan pemeriksaan RT-PCR (Widianingrum, U, 2010).

Penelitian ini mencakup 3 langkah kegiatan. Pertama propagasi hibridoma, karakterisasi antibodi monoklonal WDSSB. Kedua melakukan isolasi virus Dengue dari serum pasien yang positif mengandung virus Dengue pada sel C6/36. Ketiga mengaplikasikan antibodi monoklonal untuk mendeteksi virus Dengue dengan metode imunositokimia. Propagasi hibridoma dilakukan secara *in vitro* dan *in vivo*. Pada propagasi *in vitro* klon hibridoma dibiakkan pada medium kultur RPMI yang diperkaya FBS, penisilin-streptomisin dan anti jamur amfoterisin B pada mikroplate 24 sumuran diinkubasi pada suhu 37°C dengan CO₂

5%. Pertumbuhan sel diamati setiap hari dibawah *inverted microscope* sampai mencapai fase logaritmik. Kemudian dilakukan reploning untuk mendapatkan turunan sel hibridoma produser (Wahyono *et al.*, 1990; Sutaryo *et al.*, 1996; Umniyati *et al.*, 2003; Umniyati *et al.*, 2008).

Uji klasifikasi antibodi monoklonal dengan metode *Antigen mediated ELISA*. Uji spesifisitas antibodi monoklonal WDSSB5 dengan Dot Blot. Isolasi virus dari serum penderita pada nyamuk dan sel C6/36. Serum diencerkan dengan PBSBA 1:5. Sampel diinokulasikan intratorakal pada nyamuk *Toxorhynchites sp* umur 2-4 hari, kemudian dipelihara pada suhu 32°C dengan kelembaban relatif 80% dan diberi pakan larutan gula 10%. Setelah masa inkubasi 9-10 hari, nyamuk dipisahkan kepalanya dan bagian tubuh lainnya digerus dan dibuat suspensi dengan dapar yang mengandung protein stabilisator dan antibiotik sehingga menjadi suspensi 10%, kemudian disentrifus dan disaring.

Sel C6/36 yang telah konfluen diambil mediumnya dan disisakan sedikit, selanjutnya suspensi diinokulasikan pada sel C6/36 diadsorpsikan selama 60 menit dalam *laminary flow hood* dan digoyang setiap 10 menit. *Maintenance medium* sebanyak 5 ml dimasukkan kemudian sel diinkubasikan pada inkubator 29-30°C selama 4-5 hari tanpa CO₂. Setiap hari sel yang diinfeksi diamati di bawah *inverted microscope* dan dibandingkan dengan kontrol. Setelah sel pada tiap botol menunjukkan gejala terinfeksi antara lain adanya *giant cell* atau sel mulai ada yang lisis, sel pada tiap botol dikerok dengan *scraper*, kemudian ditampung bersama mediumnya ke dalam tabung sentrifus 15 ml dan disentrifus pada 450 g suhu 4°C selama 10 menit. Supernatan disimpan dalam -84°C. Pellet dibuat preparat untuk diperiksa infektivitasnya dengan teknik imunositokimia. Sel yang tidak diinfeksi atau kontrol juga dibuat preparat pada objek glass poly L lysin. Setelah kering preparat difiksasi dengan metanol dingin dan dikeringkan dalam suhu ruang. Setelah kering preparat dicat dengan

metode imunositokimia SBPC. Antibodi monoklonal WDSSB5 digunakan sebagai antibodi primer dengan kadar 2,2 µg/µl. Hasil kemudian diamati dibawah mikroskop cahaya. Uji ini menggunakan sediaan sel C6/36 yang diinfeksi virus Dengue 1,2,3,4 sebagai kontrol positif dan diinokulasi pada sel C6/36 yang diinkubasi selama 1-4 hari. Sedangkan kontrol negatif adalah sediaan sel C6/36 yang tidak diinfeksi virus Dengue atau sediaan sel C6/36 yang diinfeksi virus Dengue tidak diberi antibodi primer pada saat pelaksanaan uji imunositokimia SBPC. Hasil uji imunositokimia SBPC pada sediaan sel C6/36 disebut positif mengandung antigen Dengue jika sitoplasma sel berwarna coklat, sedang disebut negatif jika pada sitoplasma sel berwarna biru (Umniyati *et al.*, 2008).

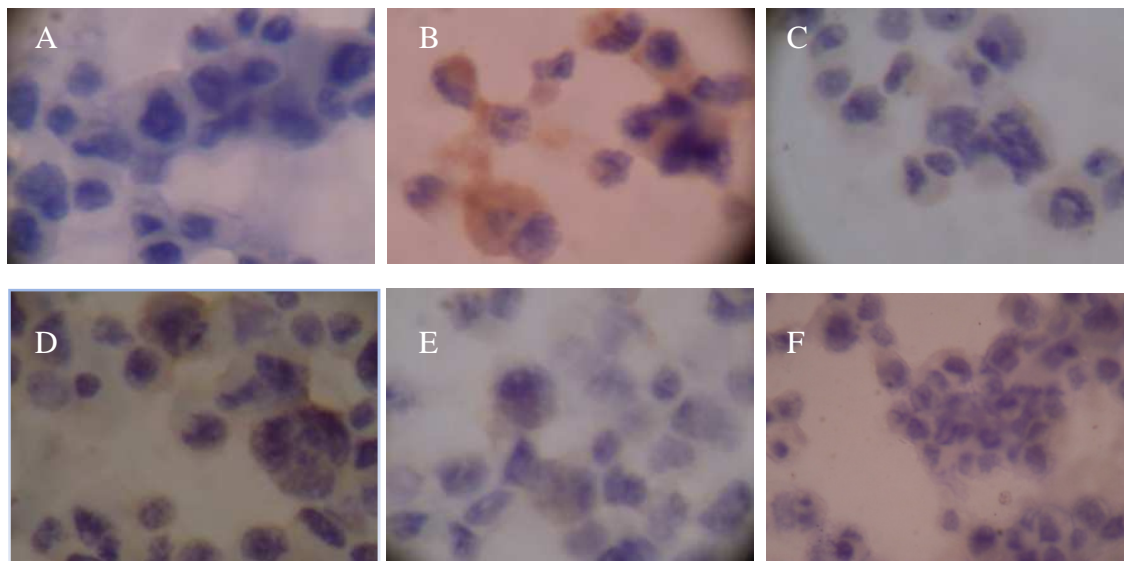
HASIL PENELITIAN

Dari hasil propogasi klon hibridoma WDSSB5 diperoleh antibodi monoklonal WDSSB dalam cairan asites sebanyak 19,5 ml. Dan hasil uji klasifikasi antibodi monoklonal dengan metode *antigen mediated ELISA* didapatkan antibodi monoklonal WDSSB5 termasuk klas IgG dan subklas IgG1. Dari hasil pemeriksaan kadar protein asites WDSSB5 diperoleh kadar protein asites sebesar 11 µg/µl. Hasil optimasi diperoleh kadar protein asites WDSSB5 2,2 µg/µl yang optimal untuk mendeteksi virus Dengue pada sediaan sel C6/36 berdasarkan metode imunositokimia SBPC dengan positif rate 100% (tabel 1). Hasil pemeriksaan mikroskopis imunositokimia SBPC menggunakan antibodi primer WDSSB5 berhasil mendeteksi antigen Dengue 3 pada sediaan sel C6/36 memperlihatkan reaksi positif yang ditunjukkan oleh warna coklat pada sitoplasma sel. Reaksi negatif ditunjukkan dengan warna biru pada kontrol negatif sel C6/36 yang tidak diinfeksi virus Dengue dan sel C6/36 yang diinfeksi virus Dengue tetapi tidak diberi antibodi primer saat pelaksanaan uji imunositokimia SBPC. Hasil pemeriksaan mikroskopis imunositokimia SBPC optimasi kadar protein asites WDSSB5 sebagai antibodi primer pada sediaan sel C6/36 disajikan pada Tabel 1.

Tabel 1. Hasil pemeriksaan imunositokimia SBPC optimasi kadar antibodi primer WDSSB5 pada sediaan sel C6/36 yang diinfeksi virus Dengue 3 inkubasi 4 hari.

Kadar Protein Asites WDSSB5 ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)	Jumlah Sel						Positif Rate (%) rata-rata
	I		II		III		
	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)	
2,2	465	0	478	0	459	0	100
1,1	389	61	405	53	411	49	88,0
0,22	347	84	367	71	353	61	83,2
0,11	309	132	317	108	299	118	72,1

Hasil pemotretan mikroskopis imunositokimia SBPC optimasi kadar antibodi monoklonal WDSSB5 disajikan pada Gambar 3.



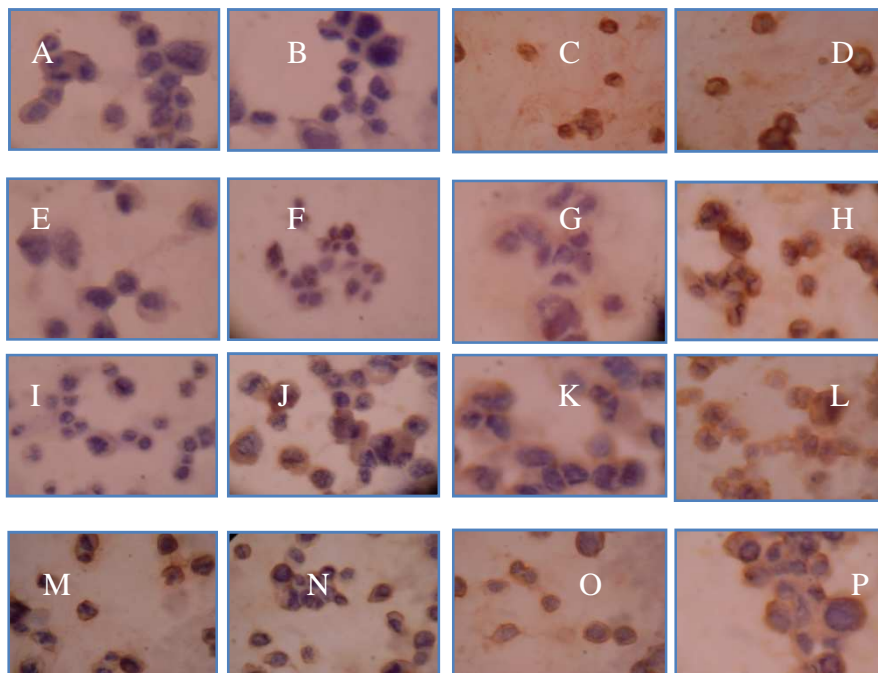
Gambar 3. Foto mikroskopis pada perbesaran 100 X 10 sediaan imonositokimia SBPC sel C6/36 yang diinfeksi virus Dengue 3 inkubasi 4 hari untuk optimasi kadar antibodi primer WDSSB5 memperlihatkan warna coklat (positif) antigen virus Dengue pada sitoplasma sel. B (2,2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$), C (1,1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$), D (0,22 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$), E (0,11 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$). Reaksi negatif (A) dan (F) sitoplasma sel C6/36 berwarna biru.

Tabel 2. Hasil pemeriksaan imunositokimia SBPC pada sel C6/36 yang diinfeksi virus Dengue 1, 2, 3, 4 inkubasi 1- 4 hari.

Serotipe Virus Dengue	Inkubasi (hari)	Jumlah Sel						Positif rate (%) rata-rata
		I		II		III		
		(+)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)	
Dengue 1	1	338	0	389	0	356	0	100
	2	353	0	333	0	367	0	100
	3	272	0	267	0	289	0	100
	4	109	0	121	0	133	0	100
Dengue 2	1	348	0	327	0	356	0	100
	2	346	0	337	0	359	0	100
	3	301	0	279	0	287	0	100
	4	255	0	223	0	248	0	100

Dengue 3	1	428	0	456	0	433	0	100
	2	366	0	349	0	357	0	100
	3	325	0	317	0	329	0	100
	4	208	0	198	0	187	0	100
Dengue 4	1	413	0	422	0	435	0	100
	2	375	0	368	0	397	0	100
	3	305	0	314	0	321	0	100
	4	188	0	176	0	197	0	100

Uji sensitivitas dan spesifisitas antibodi monoklonal WDSSB5 dengan metode imunositokimia SBPC. Hasil pemeriksaan imunositokimia SBPC dengan antibodi primer WDSSB5 2,2 µg/µl mampu mendeteksi infeksi virus Dengue 1, 2, 3, 4 pada sel C6/36 mulai masa inkubasi 1 hari dengan positif rate 100% . Hasil pemeriksaan disajikan pada tabel 2. Tabel 2 menunjukkan bahwa antibodi primer WDSSB5 dengan kadar 2,2 µg/µl mampu mendeteksi infeksi virus Dengue 1, 2, 3, 4 pada sel C6/36 yang diinkubasi mulai 1 hari dengan rata-rata positif ratenya 100%. Hal ini membuktikan bahwa antibodi primer WDSSB5 sensitif mampu mendeteksi infeksi virus Dengue 1, 2, 3, 4 sejak awal infeksi. Hasil pemetretan mikroskopis imunositokimia SBPC sediaan sel C6/36 yang diinfeksi virus Dengue 1, 2, 3, 4 yang diinkubasi 1-4 hari disajikan dalam gambar 4.



Gambar 4. Foto Mikroskopis pada perbesaran 100x10 sediaan imunositokimia SBPC sel C6/36 yang diinfeksi virus Dengue 1,2,3,4 yang diinkubasi 1,2,3,4 hari dengan antibodi primer WDSSB5 2,2 µg/µl memperlihatkan warna coklat (positif) antigen virus Dengue pada sitoplasma sel C6/36. Dengue 1 inkubasi 1,2,3,4 hari (A,B,C,D), Dengue 2 inkubasi 1,2,3,4 hari (E,F,G,H), Dengue 3 inkubasi 1,2,3,4 hari (I,J,K,L), Dengue 4 inkubasi 1,2,3,4 hari (M,N,O,P).

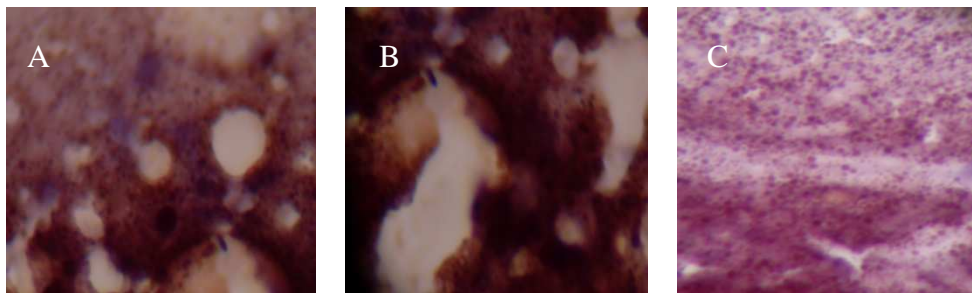
Gambar 4 menunjukkan bahwa antibodi monoklonal WDSSB5 sebagai antibodi primer mampu mengenali semua serotipe virus Dengue yang tampak pada sediaan sel C6/36 yang diinfeksi virus Dengue 1, 2, 3, 4 yang diinkubasi 1-4 hari terlihat adanya reaksi positif. Reaksi positif tersebut terlihat pada sitoplasma sel C6/36 berwarna coklat.

Sedangkan sediaan kontrol negatif dan sediaan sel C6/36 yang diinfeksi virus Dengue tidak diberi antibodi primer sitoplasma berwarna biru. Pada pengamatan mikroskopis intensitas warna coklat pada sel C6/36 yang diinkubasi 1 sampai 2 hari terlihat sitoplasma berwarna coklat muda dan jumlah sel lebih banyak, sedangkan

yang diinkubasi 3-4 hari sitoplasma berwarna coklat tua positif kuat. Pada sediaan sel C6/36 yang diinkubasi 4 hari jumlah sel sedikit sel sudah banyak yang lisis dan terdapat bercak-bercak coklat disekitar sel dan inti sel juga tampak berwarna coklat. Hal ini disebabkan waktu inkubasi lebih lama sehingga titer virus semakin tinggi.

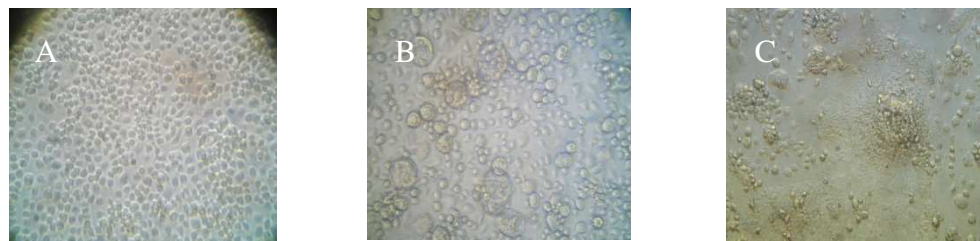
Uji spesifitas antibodi monoklonal dilakukan dengan metode Dot bot. Hasil menunjukkan bahwa antibodi monoklonal WDSSB5 menunjukkan reaksi positif terhadap antigen Dengue 1, 2, 3, 4. Pada uji ini menggunakan

antigen Dengue 1, 2, 3, 4 sebagai kontrol positif, dan antigen Dengue 1, 3 dan 4 dari isolat lokal, sedangkan kontrol negatif menggunakan PBS. Hasil isolasi Virus Dengue pada nyamuk *Toxorhynchites sp* dan Sel C6/36. Hasil pemotretan sediaan imunositokimia SBPC sediaan *head squash* memperlihatkan reaksi positif terlihat granula seperti pasir yang berwarna warna coklat pada sitoplasma sel otak nyamuk yang disuntik virus Dengue dan reaksi negatif ditunjukkan dengan warna biru pada kontrol negatif. Hasil pemotretan disajikan pada Gambar 6



Gambar 6. Foto mikroskopis perbesaran 100x10 sediaan imunositokimia SBPC *head squash* nyamuk *Toxorhynchites sp* yang disuntik intratorakal dengan serum pasien positif mengandung virus Dengue memperlihatkan hasil positif berwarna coklat (A,B). Kontrol negatif (C) sitoplasma sel berwarna biru).

Hasil inokulasi virus pada sel C6/36 memperlihatkan reaksi positif terjadi infeksi/*cytopathic effect* terdapat *giant cell* dan sel mulai ada yang lisis. Hasil pemotretan mikroskopis pada kultur sel C6/36 disajikan pada gambar 11.



Gambar 7. Foto sel C6/36 dibawah mikroskop inverted perbesaran 10x10 memperlihatkan tanda-tanda infeksi terdapat *cytopathic epec* pada sel C6/36 yang diinokulasi serum pasien positif virus Dengue (B) dan sel C6/36 yang diinokulasi Dengue 4 (C). Sedangkan A (C6/36) konfluen tidak diinfeksi virus Dengue.

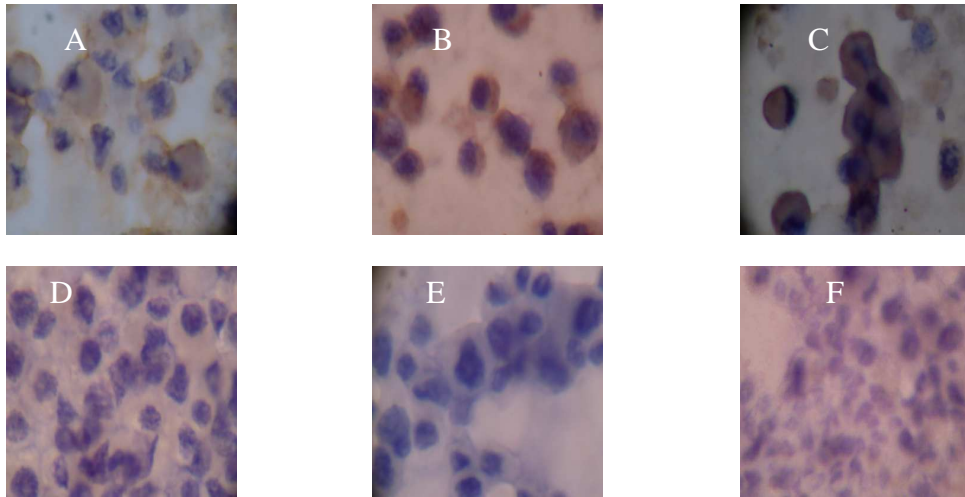
Hasil Aplikasi antibodi monoklonal WDSSB5 untuk mendeteksi virus Dengue yang berasal dari serum pasien yang positif mengandung virus Dengue yang diinokulasikan pada sel C6/36 dengan metode imunositikimia SBPC.

Hasil pemeriksaan mikroskopis imonositokimia SBPC sediaan sel C6/36 yang berasal dari serum pasien disajikan dalam Tabel 3.

Tabel 3. Hasil pemeriksaan mikroskopis imunositokimia SBPC sediaan sel C6/36 yang diinfeksi virus Dengue berasal dari serum pasien positif mengandung virus Dengue

No Sampel	Inkubasi sel C6/36 (hari)	Demam (hari)	Dengue (RT PCR)	Imunositokimia SBPC	Positif Rate rata-rata (%)
1	9	5	1	Positif	100
2	9	4	1	Positif	100
3	11	4	3	Positif	100
4	9	5	1	Positif	100
5	7	5	1	Positif	100
6	10	5	1	Positif	100
7	10	3	1	Positif	100
8	10	1	1	Positif	68.52
9	9	4	3 & 4	Positif	91.62
10	7	4	1	Positif	100
11	10	5	1	Positif	100
12	10	5	1	Positif	91.38
13	9	5	1	Positif	52.01
14	10	4	1 & 3	Positif	91.68
15	9	3	1 & 3	Positif	55.95
16	10	1	1	Positif	90.19
17	10	4	1	Positif	64.38
18	11	4	1	Positif	100
19	9	3	1	Positif	93.07
20	10	5	1	Positif	83.78
21	5	4	3	Positif	61.82
22	5	5	1	Positif	35.29
23	5	7	1	Positif	55.15
24	10	4	1	Negatif	0
25	7	5	1	Positif	100
26	5	4	1	Positif	53.36
27	7	4	3	Positif	100
28	7	4	1	Positif	100
29	5	4	4	Positif	84.22

Tabel 3 menunjukkan bahwa antibodi primer WDSSB5 berhasil mendeteksi antigen Dengue pada sediaan sel C6/36 yang terinfeksi virus Dengue yang berasal dari serum pasien yang positif dengan metode imunositokimia SBPC baik serotype Dengue 1, 3, 4. Tingkat positifnya berbeda-beda tergantung dari konsentrasi virus Dengue dan waktu inkubasi sel C6/36. Dari 29 serum pasien yang diinokulasikan pada sel C6/36 didapatkan hasil 96,5 % positif yaitu 28 positif dan 1 negatif.



Gambar 8. Foto mikroskopis perbesaran 100x10 sediaan imunositokimia SBPC sel C6/36 yang diinokulasi serum pasien positif virus Dengue memperlihatkan reaksi positif terlihat sitoplasma sel berwarna coklat. A (positif Dengue 1), B (positif Dengue 1&3), C (positif Dengue 3). D (sel C6/36 yang diinfeksi virus Dengue terlihat sitoplasma sel berwarna biru hasil negatif). Pada control negatif (E) tampak sitoplasma sel berwarna biru, F (sel C6/36 yang diinfeksi virus Dengue tidak diberi antibodi primer sitoplasma sel berwarna biru).

Hasil pemotretan mikroskopis sediaan imunositokimia sel C6/36 yang diinokulasi dengan serum pasien positif virus Dengue disajikan pada Gambar 8 memperlihatkan reaksi positif yang ditunjukkan oleh warna coklat pada sitoplasma sel C6/36 kontrol positif serta sitoplasma sel C6/36 yang terinfeksi virus Dengue yang berasal dari serum pasien. Reaksi negatif ditunjukkan dengan warna biru pada kontrol negatif, maupun pada sitoplasma sel C6/36 yang diinfeksi virus Dengue dan tidak diberi antibodi primer saat pelaksanaan uji imunositokimia SBPC.

PEMBAHASAN

Untuk propagasi *in vitro* klon hibridoma WDSSB5 yang berasal dari tabung nitrogen cair dibiakkan pada medium kultur RPMI yang mengandung FBS 20%, setelah terjadi pertumbuhan sel hibridoma pembiakan dilanjutkan menggunakan medium kultur RPMI dengan FBS 10%. Setelah terjadi pertumbuhan sel yang bagus dilakukan proses rekloning. Rekloning dilakukan untuk mendapatkan sel hibridoma yang produser dimana hanya terdapat 1 sel dalam tiap sumuran mikroplate 96 well dan diharapkan dari 1 sel tersebut akan terjadi pertumbuhan sel-sel hibridoma turunan klon yang produser yang menghasilkan antibodi monoklonal. Setelah didapatkan pertumbuhan sel-sel

hibridoma yang produser pada medium kultur, selanjutnya propagasi dilakukan secara *in vivo* pada mencit Balb/c. Mencit Balb/c yang telah disensitisasi dengan pristan 0,5 ml intra peritoneal sebanyak 4 kali dengan interval waktu 2 minggu sekali. Pristan berfungsi sedikit immunosupresi dan mempercepat pembentukan cairan asites. Kemudian mencit disuntik dengan suspensi klon produser sebanyak 10^6 – 10^7 sel per ekor. Setelah abdomen membesar cairan asites diambil beberapa kali sampai asites menjadi tumor. Pada penelitian ini dihasilkan cairan asites sebanyak 19,5 ml dengan dua kali pengambilan. Hal ini mendukung penelitian sebelumnya dilakukan oleh Umniyati, *et al*, 2008 telah berhasil memproduksi antibodi monoklonal yang berasal dari sel hibrid DSSC7 secara *in vivo* pada mencit Balb/c sebanyak 50 ml.

Menurut Goding (1983) Produksi antibodi monoklonal secara *in vitro* dan *in vivo* mempunyai kelebihan dan kekurangan. Konsentrasi antibodi monoklonal dari hasil pembiakan *in vitro* dapat mencapai sekitar 1-10 µg/ml, sedangkan konsentrasi dari hasil pembiakan *in vivo* dapat mencapai kadar 1000 kali lipat (mg/ml) dari cara *in vitro*. Kadar imunoglobulin produksi *in vitro* lebih menguntungkan, dari segi kemurniannya, karena hanya sedikit terkontaminasi protein lain yang berasal

dari medium, sedangkan pada *in vivo* terkontaminasi protein lain yang berasal dari mencit. Sehingga untuk pengembangan lebih lanjut antibodi monoklonal misalnya untuk pelabelan antibodi monoklonal perlu dilakukan purifikasi untuk mendapatkan antibodi monoklonal yang murni.

Karakter spesifik yang dimiliki suatu antibodi monoklonal adalah merupakan syarat utama untuk berbagai teknik reaksi imunologi. Sifat utama antibodi monoklonal ditentukan oleh struktur dari molekul antibodi tersebut, yang ditentukan oleh sekuens asam amino yang membentuknya, termasuk disini adanya klas dan subklas dari suatu antibodi (Artama,1992).

Pada penelitian ini hasil uji klasifikasi menunjukkan antibodi monoklonal WDSSB5 termasuk klas IgG dan subklas IgG1. Hal ini mendukung penelitian Sutaryo *et al.*, 1996 yang telah berhasil memproduksi antibodi monoklonal terhadap virus Dengue 3 yang berasal dari sel hibrid DSSC7 yang termasuk klas IgG1 dan dapat mengenal antigen Dengue pada berat molekul 48 kDa berdasarkan analisis epitop dengan metode *Western Blotting*. Pada penelitian ini telah dilakukan uji spesifisitas antibodi monoklonal dengan metode *Western Blotting*, tetapi hasil yang diperoleh tidak memuaskan untuk diambil kesimpulan karena epitopnya tidak terdeteksi kemungkinan disebabkan epitopnya konformasional. Selain itu kemungkinan disebabkan oleh tidak terjadi denaturasi pada saat pemanasan antigen sebelum dilakukan transfer dengan SDS, sehingga tidak terjadi fragmentasi protein dan setelah dilakukan imunoblotting antibodi tidak mengenali epitop. Sehingga pada penelitian untuk mengetahui spesifisitas antibodi monoklonal terhadap antigen Dengue dilakukan dengan metode Dot blot. Kelemahannya Dot blot hanya dapat mengetahui jenis antigen tidak dapat mengetahui berat molekul protein. Metode ini cukup baik digunakan untuk skrining dengan sampel yang cukup banyak (Ratam,2003).

Dari hasil pemeriksaan kadar protein dengan metode *Biorad mikro assay* asites didapatkan kadar protein asites WDSSB5 sebesar 11 mg/ml

menggunakan larutan baku *Bovin Serum Albumin* (BSA), ini membuktikan bahwa produksi antibodi monoklonal *in vivo* mempunyai konsentrasi tinggi mencapai kadar 1000 kali lipat cara *in vitro* (Goding, 1983). Kelemahan pada penelitian ini adalah tidak dilakukan purifikasi sehingga kadar protein yang didapat tersebut masih merupakan Crude protein yang dipengaruhi oleh protein lain yang berasal dari mencit.

Pada penelitian ini dilakukan optimasi pengenceran kadar protein asites untuk menetapkan kadar terkecil (pengenceran tertinggi) dari antibodi monoklonal WDSSB5 yang dapat mendeteksi antigen Dengue secara optimal berdasarkan metode imunositokimia SBPC. Optimasi dilakukan menggunakan sediaan sel C6/36 yang diinfeksi virus Dengue 3 karena sel hibrid WDSSB5 merupakan hasil fusi antara splenosit imun mencit terhadap virus Dengue 3. Hasil pemeriksaan mikroskopis imunositokimia SBPC (tabel 1) menunjukkan antibodi monoklonal sebagai antibodi primer dengan kadar 2,2 µg/µl dengan volume 20 µl berhasil mendeteksi antigen Dengue 3 yang diinokulasi pada sel C6/36 inkubasi 4 hari dengan positif ratenya 100%.

Penelitian sebelumnya oleh Umniyati *et a.*,2008a; menggunakan antibodi monoklonal DSSC7 dengan konsentrasi 1:10; 1:50; 1:100 sebagai antibodi primer dengan metode imunositokimia SBPC untuk mendeteksi infeksi virus Dengue pada *abdomen squash* dan *head squash* nyamuk *Ae. aegypti* setelah inkubasi 5 hari dengan *infection rate* 33,35% dan 75%. Penelitian ini memperlihatkan hasil yang lebih baik dari pada penelitian tersebut karena waktu inkubasi lebih pendek dan positif ratenya lebih tinggi.

Pada penelitian ini sensitivitas dan spesifisitas antibodi monoklonal WDSSB5 dilakukan dengan metode imunositokimia SBPC menggunakan sediaan sel C6/36 yang diinfeksi virus Dengue 1, 2, 3, 4 dengan waktu inkubasi 1-4 hari. Hasil pemeriksaan mikroskopis imunositokimia SBPC (tabel 2) menunjukkan bahwa antibodi monoklonal WDSSB5 sebagai antibodi primer mampu mendeteksi antigen

Dengue 1, 2, 3, 4 pada sel C6/36 dan sensitive mulai dapat terlihat pada inkubasi 1 hari. Hal ini menunjukkan bahwa antibodi primer WDSSB5 dengan kadar 2,2 µg/µl dengan metode imunositokimia SBPC dapat mendeteksi antigen Dengue lebih awal sebelum siklus hidup virus berlangsung secara sempurna. Dengan demikian antibodi monoklonal WDSSB5 mengenali camon epitop antigen Dengue. Kelemahan pada uji ini tidak dilakukan uji spesifitas menggunakan sediaan sel C6/36 yang diinfeksi virus Chikungunya, sehingga spesifitasnya terhadap virus Chikungunya tidak diketahui. tetapi dalam pelaksanaan uji imunositokimia selalu disertakan kontrol positif dan kontrol negatif.

Inokulasi pada nyamuk *Toxorhynchites sp* bertujuan untuk meningkatkan titer virus yang terdapat pada serum, karena jika tidak dilakukan inokulasi pada nyamuk kemungkinan titer virus di dalam serum sangat kecil. Selain itu untuk menghindari kontaminasi dari mikroorganisma lain karena pada proses penyaringan hasil gerusan nyamuk menggunakan filter 0,22 µ, sehingga semua mikroorganisme lain bisa tersaring kecuali virus, hal ini dapat menghindari kontaminasi saat dilakukan inokulasi pada sel C6/36.

Pada penelitian sebelumnya oleh Samuel dan Tyagi (2006) melakukan inokulasi pada nyamuk *Toxorhynchites sp* dan nyamuk *Aedes sp* untuk isolasi virus Dengue, terutama untuk mempertinggi titer virus. Kepadatan isolasi virus Dengue pada sel C6/36 mencapai 36% sedangkan pada inokulasi pada nyamuk bisa mencapai 80%.

Hasil inokulasi virus pada sel C6/36 pada penelitian ini 96,5% positif berdasarkan hasil pemeriksaan mikroskopis imunositokimia SBPC. Dari 29 sampel serum positif (RT PCR) setelah dilakukan inokulasi pada sel C6/36 dan hasil pemeriksaan mikroskopis imunositokimia SBPC diperoleh hasil 28 sampel positif dan 1 sampel negatif. Inokulasi pada sel C6/36 membutuhkan waktu inkubasi yang berbeda-beda berkisar antara 5-12 hari, hal ini tergantung dari timbulnya tanda-tanda infeksi/*cytophatic epec* seperti adanya *giant cell* atau sel mulai lisis.

Pada sampel yang menunjukkan rekasi positif *cytophatic epec* tampak jelas terlihat, tetapi pada sampel yang menunjukkan reaksi negatif tidak terdapat *cytophatic effect*.

Hasil Aplikasi antibodi monoklonal WDSSB5 untuk mendeteksi virus Dengue yang berasal dari serum pasien yang positif mengandung virus Dengue yang diinokulasi pada sel C6/36 dengan metode imunositokimia SBPC

Deteksi virus Dengue 1, 2, 3, 4 yang diisolasi pada sel C6/36 pertama kali dilakukan oleh Igarashi (1978) dengan teknik *fluorescent antibody staining*. Hasil positif antigen Dengue berupa gambaran *fluorescent kehijauan*. Pada penelitian ini deteksi antigen Dengue 1, 2, 3, 4 dilakukan dengan metode imunositokimia SBPC. Hasil positif ditandai dengan terdapatnya warna coklat pada sitoplasma sel yang terinfeksi (Umniyati *et al.*, 2008a).

Deteksi antigen Dengue dengan metode imunositokimia SBPC ini menggunakan sediaan sel C6/36 yang diinfeksi virus Dengue 1, 2, 3, 4. Hal yang mendasari adalah adanya glikoprotein 40 dan 45 kDa pada permukaan sel merupakan reseptor untuk virus Dengue²⁶. Proses replikasi virus Dengue berlangsung di sitoplasma sel². Antigen virus Dengue yang terlokalisir pada sitoplasma sel akan berikatan dengan antibodi monoklonal WDSSB5 yang akan dikenali oleh antibodi sekunder yang berlabel biotin. Selanjutnya dengan penambahan konjugat streptavidin yang dilabel enzim radish peroxidase dan larutan substrat kromogen, maka antigen tersebut dapat terdeteksi dengan terdapatnya warna kecoklatan pada sitoplasma sel yang terinfeksi.

Pada penelitian ini antibodi monoklonal WDSSB5 sebagai antibodi primer dapat mendeteksi antigen Dengue pada sediaan sel C6/36 yang diinfeksi virus Dengue yang berasal dari serum pasien positif yang mengandung virus Dengue pada fase akut penyakit yaitu pasien demam hari ke-1 sampai hari ke-7. Hari demam atau hari pengambilan sampel berhubungan dengan keberadaan antigen virus Dengue yang dapat terdeteksi dengan uji imunositokimia SBPC. Menurut WHO²⁷,

setelah onset penyakit virus Dengue dapat dideteksi di dalam serum, plasma, sel-sel darah dan jaringan lain selama 4-5 hari. Selama fase ini, isolasi virus, deteksi asam nukleat maupun deteksi antigen Dengue dapat digunakan untuk menegakkan diagnosis infeksi virus Dengue.

Dari hasil pemeriksaan mikroskopis imunositokimia SBPC sediaan sel C6/36 pada table 3 terdapat 13 sampel yang mempunyai positif rate rata-rata 100% dimana pada saat pengamatan terlihat reaksi positif kuat warna coklat sangat jelas pada sitoplasma sel, banyak giant cell, bentuk sel tidak beraturan, inti sel mengecil, juga ditemukan inti sel berwarna coklat, sel lisis dan terdapat bercak-bercak antigen disekitar sel. Sedangkan pada sampel dengan positif rate rata-rata 35,29% terlihat reaksi positif lemah warna coklat tidak begitu jelas hal ini mungkin disebabkan waktu inkubasi kurang lama sehingga sel yang terinfeksi sedikit. Pada sampel yang negative (T24) dengan waktu inkubasi sepuluh hari, tetapi saat kultur sel dipanen tidak terlihat gejala infeksi yang jelas. Hal ini kemungkinan disebabkan konsentrasi virus sedikit karena nyamuk *Toxorhynchites sp* yang berhasil disuntik hanya satu yang hidup meskipun sudah dilakukan pengulangan 3 kali. Sedangkan pada sampel yang menunjukkan hasil positif jumlah nyamuk yang hidup lebih banyak yaitu 3-5 ekor, sehingga titer virus lebih tinggi.

Selama ini, uji imunositokimia SBPC telah dikembangkan untuk mendeteksi virus Dengue pada berbagai organ nyamuk seperti pada *head squash*, *abdomen squash*, jaringan paraffin atau pada *buffi coat* juga pada sediaan apus darah manusia. Di sisi lain, deteksi virus Dengue pada sel C6/36 merupakan salah satu bagian yang penting dalam kegiatan pengembangan antibodi monoklonal sebagai alat diagnostik.

Uji imunositokimia SBPC dengan antibodi WDSSB5 dapat dijadikan salah satu metode deteksi virus Dengue pada kultur sel. Metode ini terbukti memiliki sensitivitas dan spesifitas yang tinggi untuk mendeteksi antigen Dengue1, 2, 3, 4 pada sel C6/36. Metode imunositokimia SBPC mempunyai

kelebihan karena dapat menggunakan mikroskop cahaya dan tidak memerlukan ketrampilan khusus juga relatif lebih mudah, murah serta dapat dilakukan di laboratorium-laboratorium sederhana.

KESIMPULAN

Didapatkan antibodi monoklonal WDSSB5 spesifik terhadap virus Dengue. Antibodi monoklonal WDSSB5 termasuk kelas IgG dan subkelas IgG1. Antibodi monoklonal WDSSB5 sebagai antibodi primer dapat di aplikasikan untuk mendeteksi virus Dengue pada sel C6/36 yang berasal dari serum pasien positif mengandung virus Dengue dengan menggunakan metode imunositokimia SBPC

DAFTAR PUSTAKA

- Aryati. 2006. Aspek laboratorium DBD. Dalam: S.Soegijanto, *Demam Berdarah Dengue*, Edisi 2, p. 117-30. Airlangga University Press, Surabaya
- Artama, W.T. 1992. Pedoman Kuliah Antibodi Monoklonal, Teori, Produksi, Karakterisasi dan Penerapan. PAU-Bioteknologi UGM.Yogyakarta.
- Buchy, P., Yoksan, S., Peeling, R.W., Hunsperger, E. 2006. Laboratory Test for The Diagnosis of Dengue Virus Infection, Scientific Working Group, Report on Dengue, 1-5 October 2006, Geneva, Switzerland.
- Depkes. RI. 1999. Pedoman Tatalaksana Demam Berdarah di Indonesia, Jakarta.
- Goding, J.W. 1983. *Monoclonal Antibodies Principle and Practice*, Academic press, Inc, London.
- Igarashi, A. 1978. Isolation of a Singh's *Aedes albopictus* Cell Clone Sensitive to Dengue and Chikungunya Viruses. *J. Gen. Virol.* 40: 531-544.
- Kuno, G., Gubler, D.J., Velez, M., Oliver, A. 1985. Comparative Sensitivity of Three Mosquito Cell Lines for Isolation of Dengue Viruses. *Bull. WHO.* 63(2):279-286.
- Listiyaningsih, E. 2005. Prediksi Evolusi Genetik Virus Dengue di Indonesia. Dalam Seminar Kajian KLB dari Biologi Molekuler sampai Pemberantasannya. Pusat Kedokteran Tropis, Fakultas Kedokteran Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.

- Osman, O., Fong, Y.M., Devi, S. 2007. Preliminary Study of Dengue Infection in Brunei. Faculty of Medicine University of Malaya. *Jpn. J. Infect. Dis.*, 60,205-208.
- Paula, D., Lima M.D., Clotteau, M. 2002. Improved Detection of Dengue -1 Virus from IgM-Positive Serum Samples Using C6/36 Cell Cultures in Association with RT-PCR. *Intervirology*. 46:227-231.
- Ramos-Vara, J.A. 2005. Technical aspect of immunohistochemistry. *Vet. Pathol.* 42: 405-426.
- Rantam, A.F. 2003. Metode Immunologi, Edisi I. Penerbit Airlangga University Press, Surabaya.
- Samuel, P., Tyagi, B.K. 2006. Diagnostic Methods for Detection & Isolation of Dengue Virus from Vector Mosquitoes. *Indian J. Med. Res.* 123, pp 615-628.
- Soegijanto S, 2006, Demam Berdarah Dengue, edisi ke-2, Airlangga University Press, Surabaya.
- Sutaryo, Umniyati, S.R., Wahyono, D. 1996. Produksi antibodi monoklonal terhadap virus dengue-3 untuk Deteksi penderita Demam Berdarah Dengue dan vektornya. *Laporan Penelitian RUT-3 Tahun I*. FK UGM, Yogyakarta.
- Sutaryo, Umniyati, S.R., Wahyono, D. 1997. Produksi antibodi monoklonal terhadap virus dengue-3 untuk Deteksi penderita DBD dan vektornya. *Laporan Penelitian RUT-3 Tahun II*. FK UGM, Yogyakarta.
- Sutaryo, Umniyati, S.R., Wahyono, D. 1998. Produksi antibodi monoklonal terhadap virus dengue-3 untuk Deteksi penderita DBD dan vektornya. *Laporan Penelitian RUT-3 Tahun III*. FK UGM, Yogyakarta.
- Sutaryo. 2004. *Dengue*, Penerbit Medika. Fakultas Kedokteran Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta. pp: 17-9.
- Umniyati, S.R., Soeyoko, Mulyaningsih, B. 2003. *Pengembangan antibodi monoklonal anti Dengue-3 produksi local Universitas Gadjah Mada untuk Deteksi infeksius Virus Dengue pada nyamuk Aedes spp.* Laporan penelitian Hibah Bersaing X/I, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.
- Umniyati, S.R., Sutaryo, Wahono, D., Artama, W.T., Mardihusodo, S.J., Soeyoko, Mulyaningsih, B., and Utoro, T. 2008a. Application of monoclonal antibody DSSC7 for detecting dengue infection in *Aedes aegypti* based on immunocytochemical streptavidin biotin peroxidase complex assay (ISBPC). *Dengue Bulletin*. 32: 83-98.
- Umniyati, S.R., Sutaryo, Wahyono, D., Artama, W.T. 2008b. *Application of monoclonal antibody DSSC7 for early detection of dengue infection in blood smear preparation based on immunocytochemical streptavidin biotin peroxidase complex assay*. Int. Joint. Symp. Frontier Sciences from gene to application. Faculty of Medicine. Universitas Gadjah Mada.
- Umniyati, S.R. 2009. Teknik imunositokimia dengan antibody monoklonal DSSC7 untuk kajian pathogenesis infeksi dan penularan transovarial virus dengue serta surveilansi virologist vector dengue. Disertasi, UGM, Yogyakarta.
- Wahyono, D., Pichazyk, M., Mourton, C., Marie Bastide, M., Bernard PAU. 1990. Novel anti-digoxin monoclonal antibodies with differen binding specificities for digoxin metabolites and other glycosides. *Hibridoma*. 9: 619-30.
- Widyaningrum, U. 2010. Evaluasi uji Imunositokimia untuk deteksi infeksi virus dengue pada sediaan apus darah ntpis dan tebal penderita demam, Tesis untuk Derajat Master dalam Ilmu Kedokteran Tropis, Program Pascasarjana, Univeritas Gadjah Mada.
- World Health Organization SEARO, 2003. Pencegahan dan Penanggulangan Penyakit Demam Dengue dan Demam Berdarah Dengue, Depkes RI. Jakarta.
- World Health Organization. 2008. Dengue status in South East Asia Region : An epidemiologicalperspective. Available from : http://www.searo.who.int/LinkFiles/Dengue_dengue-SEAR-2008.pdf
- Wuryaningsih, S.N. 2007. Deteksi Virus Den pada Monosit dengan Uji Streptavidin Biotin untuk Diagnosis Dini Penyakit Demam Berdarah Dengue. Fakultas Kedokteran Universitas Sebelas Maret, Surakarta.