

## Deteksi Molekuler Virus Chikungunya pada Nyamuk *Aedes aegypti* menggunakan metode *TWO-STEP* RT-PCR

Alvira Rifdah Sativa, Endang Srimurni Kusmintarsih, Trisnowati Budi Ambarningrum

Fakultas Biologi, Universitas Jenderal Soedirman  
Jalan dr Suparno 63 Purwokerto 53122  
Email: [alvirarifdahsativa@gmail.com](mailto:alvirarifdahsativa@gmail.com)

### Rekam Jejak Artikel:

Diterima : 29/08/2019  
Disetujui : 30/05/2020

### Abstract

The Chikungunya fever is a disease caused by an Alphavirus of the family Togaviridae with the symptoms of a patient's posture that is bent over by severe joint pain (arthralgia). Chikungunya disease can be transmitted to humans through *Aedes aegypti* as a vector. The outbreak of Chikungunya in Indonesia was first reported in 1973 in Samarinda and then spread to various other regions. Surveillance data show almost every year of the outbreak occurred in various regions in Indonesia. In 2013 there was the outbreak of Chikungunya in North Purwokerto, especially in Bancarkembar and Grendeng. Until now, the medicine or vaccine has not been found to prevent Chikungunya disease. The purpose of this research is to know the infection of Chikungunya virus (CHIKV) on *A. aegypti*. This research was conducted by survey methods employing purposive sampling technique. The observed parameter is the positivity of CHIKV. Data were analyzed descriptively by observing the appearance of DNA bands on UV transilluminator. The results revealed that the amplicon of cDNA CHIKV was not detected by the use of the two step RT-PCR method.

**Key Words :** *Aedes aegypti*, Chikungunya, DNA, Vector

### Abstrak

Demam Chikungunya adalah suatu penyakit yang disebabkan oleh virus *Alphavirus* dari familia *Togaviridae* dengan gejala postur penderita yang membungkuk akibat nyeri sendi hebat (*arthralgia*). Penyakit Chikungunya dapat ditularkan ke manusia melalui nyamuk vektor *Aedes aegypti*. Kejadian Luar Biasa (KLB) Chikungunya di Indonesia pertama kali dilaporkan pada tahun 1973 di Samarinda dan kemudian menyebar ke berbagai wilayah lainnya. Data surveil menunjukkan hampir setiap tahun terjadi KLB di berbagai wilayah di Indonesia. Pada tahun 2013 terjadi KLB Chikungunya di Purwokerto Utara, khususnya wilayah Bancarkembar dan Grendeng. Hingga saat ini belum ditemukan obat ataupun vaksin untuk mencegah penyakit Chikungunya. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui infeksi virus Chikungunya (CHIKV) pada nyamuk dewasa *A. aegypti*. Penelitian ini dilakukan dengan metode survei dengan pengambilan sampel menggunakan teknik *purposive sampling* *A. aegypti*. Parameter yang diamati adalah positività CHIKV. Analisis data dilakukan secara deskriptif dengan mengamati kemunculan pita DNA pada UV *Transilluminator*. Hasil penelitian menunjukkan bahwa amplicon cDNA CHIKV tidak terdeteksi dengan metode *two step* RT-PCR.

**Kata Kunci :** *Aedes aegypti*, Chikungunya, DNA, Vektor.

## PENDAHULUAN

Penyebaran penyakit yang disebabkan oleh virus Chikungunya membutuhkan interaksi antara vektor, inang dan lingkungan. Chikungunya merupakan salah satu penyakit zoonosis yang disebarkan oleh nyamuk *Aedes aegypti*. (Ochieng, *et al.*, 2013). Demam Chikungunya merupakan suatu penyakit yang disebabkan oleh virus *Alphavirus* dari familia *Togaviridae* dengan gejala postur penderita yang membungkuk akibat nyeri sendi hebat (*arthralgia*) (Ekawasti & Martindah, 2016).

Virus Chikungunya merupakan salah satu anggota "*group A*" *arthropode borne viruses* dalam genus *alphavirus* familia *Togaviridae*. Virus Chikungunya ditularkan melalui vektor utama *A. aegypti*. Virus Chikungunya termasuk kelompok virus *single strand* RNA (ssRNA) yang mempunyai selubung dengan diameter 60-70 nm (Caglioti, *et*

*al.*, 2013). Virus Chikungunya juga merupakan *re-emerging diseases* yang sering menyebabkan Kejadian Luar Biasa (KLB) di berbagai wilayah di kawasan Asia termasuk Indonesia (Maha & Subangkit, 2014).

Kejadian Luar Biasa (KLB) Demam Chikungunya di Indonesia dilaporkan pertama kali di Samarinda pada tahun 1973. Secara epidemiologis, hampir seluruh wilayah di Indonesia berpotensi untuk timbulnya KLB Demam Chikungunya (Kemenkes RI, 2012). Data Dinas kesehatan Provinsi Jawa Tengah menyatakan 17 Kabupaten atau kota masuk dalam kategori Kejadian Luar Biasa (KLB) penyakit Demam Chikungunya, salah satunya adalah Kabupaten Banyumas. Peningkatan kasus Chikungunya di Jawa Tengah terjadi mulai tahun 2005 yang berjumlah 46 kasus, tahun 2006 menjadi 86 kasus dan pada 2007

meningkat mencapai 2.801 kasus (Dinkes, 2012). Menurut DKK Banyumas (2016) pada tahun 2015 terjadi peningkatan kasus Chikungunya di Banyumas dari 270 kasus menjadi 361 kasus. Kota Purwokerto termasuk daerah endemis dan Kecamatan Purwokerto Utara menempati urutan pertama daerah endemis Chikungunya. Daerah endemis adalah daerah yang dalam kurun waktu 3 tahun selalu terdapat kasus Chikungunya.

Nyamuk *A. aegypti* berperan sebagai vektor utama dalam melanjutkan proses siklus hidup virus dan memindahkannya dari penderita ke hospes rentan tanpa menyebabkan penyakit pada tubuh nyamuk (Forman *et al.*, 2008). Penularan ini terjadi karena setiap kali nyamuk menggigit (menusuk dan menghisap), sebelum nyamuk menghisap darah akan mengeluarkan air liur melalui probosisnya agar darah yang dihisap tidak membeku. Bersama air liur inilah virus dipindahkan dari nyamuk ke inang lain (Schneider BS & Higgs, 2008).

Menurut Mahmud *et al.* (2017) hingga saat ini belum ada vaksin yang tersedia untuk mencegah penyakit Chikungunya. Oleh karena itu salah satu pengendalian yang dapat dilakukan adalah dengan mendeteksi virus di dalam tubuh nyamuk sebelum menginfeksi manusia. Pengawasan vektor merupakan salah satu cara untuk mendeteksi aktivitas virus di dalam tubuh vektor sehingga potensi kejadian penyakit di masa yang akan datang dapat diketahui (Hall, *et al.*, 2012). Deteksi ini dapat dilakukan dengan berbagai metode, salah satunya *Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction* (RT-PCR) (Macedo, *et al.*, 2013). Hal ini diperkuat pada penelitian sebelumnya oleh Herkilini, *et al* (2017) bahwa teknik *reverse transcriptase* PCR (RT-PCR), terdiri dari dua tahap yaitu sintesis cDNA dari mRNA dan amplifikasi cDNA dengan teknik PCR. RT-PCR digunakan untuk mendapatkan panjang klon DNA secara utuh dari jumlah mRNA yang sangat sedikit.

Berdasarkan uraian di atas didapatkan rumusan masalah sebagai berikut, bagaimana distribusi virus Chikungunya pada vektornya. Tujuan penelitian ini untuk mengetahui infeksi virus Chikungunya pada nyamuk dewasa *A. aegypti*. Hasil dari penelitian ini diharapkan dapat digunakan sebagai informasi awal untuk prediksi penularan penyakit Chikungunya.

## MATERI DAN METODE

### Pengambilan Sampel

Penelitian dilakukan di Kecamatan Purwokerto Utara, Kabupaten Banyumas, Jawa Tengah. Lokasi pengambilan sampel pada 3 desa, yaitu Desa Grendeng, Desa Bancarkembar dan Desa Purwanegara berdasarkan kejadian terjadinya Chikungunya. Metode pengambilan sampel yang digunakan adalah metode survei dengan teknik *purposive sampling*.

### Ekstraksi RNA

Menurut Sari *et al.* (2012) prosedur ekstraksi RNA diawali dengan membuat larutan sampel, yaitu Nyamuk *A. aegypti* dimasukkan ke dalam eppendorf dan ditambahkan dengan air DEPC sebanyak 200  $\mu$ l, kemudian digerus dengan menggunakan *grinder*. Tahapan selanjutnya adalah Preparasi *working solution*, yaitu dengan 210  $\mu$ l Lysis buffer ditambahkan 5,88  $\mu$ l Carrier RNA dan divortex. Selanjutnya ke dalam eppendorf 1.5 ml steril ditambahkan 200  $\mu$ l larutan sampel nyamuk, 20  $\mu$ l Proteinase K dan 200  $\mu$ l *working solution* (yang baru disiapkan sesaat sebelumnya) lalu divortex selama 15 detik hingga homogen, kemudian diinkubasi 15 menit pada suhu 56° C dan disentrifugasi dengan kecepatan rendah. Setelah selesai lalu ditambahkan 250  $\mu$ l Etanol dan divortex hingga homogen, kemudian diinkubasi kembali selama 5 menit pada suhu ruang (25° C) dan disentrifugasi dengan kecepatan rendah. Sampel dipindahkan ke dalam *viral spin column* bersama *collection tube* dan disentrifuse selama 1 menit pada 6800x g. *Collection tube* dilepaskan dan kemudian dipasangkan *viral spin column* pada *wash tube* baru. Selanjutnya ditambahkan 5000  $\mu$ l Wash Buffer dan disentrifuse selama 1 menit pada 6800x g, lalu filtrat dan *collection tube* dibuang, kemudian dipasangkan *viral spin column* pada *wash tube* baru. Selanjutnya ditambahkan lagi 500  $\mu$ l Wash Buffer dan disentrifuse selama 1 menit pada 6800x g, filtrat dan *collection tube* dibuang, kemudian dipasangkan *viral spin column* pada *wash tube* baru, filtrat dibuang dan disentrifuse kembali selama 1 menit pada kecepatan maksimum (13000x g). *Collection tube* dibuang dan *viral spin column* dipasang ke dalam eppendorf 1.5 ml steril dan ditambahkan 50  $\mu$ l RNase free water lalu diinkubasi selama 1 menit pada suhu ruang (25° C). Kemudian disentrifuse selama 1 menit pada kecepatan maksimum (13000x g). *Viral spin column* dibuang dan RNA virus siap digunakan untuk PCR.

### Sintesis cDNA dari sampel nyamuk

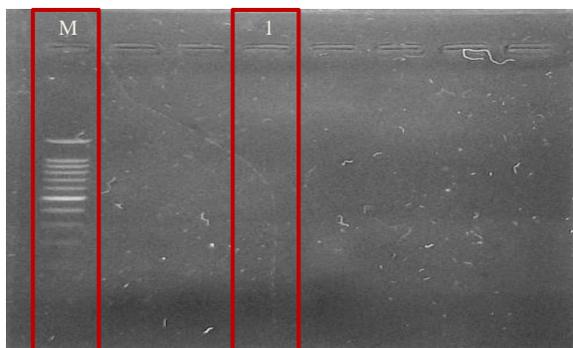
Sintesis cDNA menggunakan kit SuperScript III First Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen) yang diawali dengan mencampurkan 7  $\mu$ l RNA sampel nyamuk, 1  $\mu$ l primer oligo (dT), 10 Mm dNTP sebanyak 1  $\mu$ l kedalam eppendorf, DEPC water 1  $\mu$ l, dan inkubasi selama 5 menit pada suhu 65°C, lalu *chill* di es selama 2 menit. Selanjutnya pembuatan mix sintesis cDNA dengan komponen 10x RT Buffer 2  $\mu$ l, 25 Mm MgCl<sub>2</sub> 4  $\mu$ l, 0,1 M DTT 2  $\mu$ l, RNase out 1  $\mu$ l, Superscript III 1  $\mu$ l, kemudian masukkan 10  $\mu$ l mix sintesis cDNA yang baru dibuat ke dalam tube sampel, dilanjutkan dengan inkubasi selama 50 menit pada suhu 50°C, inkubasi kembali selama 5 menit pada suhu 85°C, lalu di *chill* pada es selama 1 menit. Tambahkan 1  $\mu$ l RNase H, inkubasi kembali selama 20 menit pada suhu 37°C. Selanjutnya sampel disimpan pada suhu -20°C.

### Deteksi virus Chikungunya dengan metode *Two step* RT PCR

Deteksi RNA virus Chikungunya, menggunakan metode *Two step* menggunakan My Taq PCR Kit-Bioline dengan primer universal untuk virus Chikungunya yaitu Chick 1 (5'- ACC GGC GTC TAC CCA TTC ATG T-3') dan Chick 2 (5'- GGG CGG GTA GTC CAT GTT GTA GA-3'). Kemudian tabung PCR disiapkan dan diberi kode sesuai dengan kode RNA yang akan di-PCR. Selanjutnya Mix reagen disiapkan sesuai jumlah sampel yang akan diperiksa. Komponen *mix reagent* per reaksi, yaitu 2 × MyTaq HS Red Mix 12,5 µL, primer *forward* (Chick 1) 1 µL, primer *reverse* (Chick 2) 1 µL, dan ddH<sub>2</sub>O 9,5 µL, serta 1 µL template cDNA. Selanjutnya dilakukan *spinning down* sampai tidak ada sampel/reagen yang tertinggal menempel di dinding tabung. Mesin *thermocycle* disiapkan untuk proses PCR dan sampel dimasukkan ke dalam mesin. Proses PCR dilakukan dengan *setting*, yaitu (i) predenaturasi 1 siklus (95° C; 1 menit; (iii) amplifikasi 35 siklus yang terdiri dari denaturasi (95° C; 15 detik), *annealing* (60° C; 15 detik), dan ekstensi (72° C; 10 detik); (iv) post ekstensi 1 siklus (72° C; 5 menit); dan (v) *hold* (4° C). Elektroforesis gel agarosa 1,5% dilakukan pada 100 volt selama 50 menit. Pewarna cDNA yang digunakan adalah SYBR *green fluorescent dye* dan 100 bp DNA ladder digunakan sebagai marka untuk menganalisis besar produk PCR. Visualisasi pita cDNA dilakukan menggunakan UV *Transilluminator* dan hasil positif apabila pita cDNA berukuran 330 bp.

### HASIL DAN PEMBAHASAN

Deteksi virus Chikungunya pada sampel nyamuk asal wilayah Purwokerto Utara menggunakan metode *Two step* RT-PCR menunjukkan hasil negatif. Hal ini dapat dilihat dari tidak tampaknya pita pada sampel setelah dielektroforesis dan hanya marka DNA (*ladder*) yang terlihat (Gambar 1).



**Gambar 1.** Hasil Deteksi CHIKV pada Nyamuk *A. aegypti* dengan metode *Two Step* RT-PCR pada gel Agarose 1,5 %.

Keterangan : (M) marka DNA (100 pb); (1) Sampel nyamuk wilayah Purwokerto Utara.

Deteksi virus Chikungunya dapat dilakukan dengan deteksi antibodi oleh serodiagnosis ataupun deteksi molekuler menggunakan RNA virus. Amplifikasi tidak dapat dilakukan dengan menggunakan RNA sebagai template atau cetakan, sehingga pada sampel RNA perlu dilakukan proses transkripsi balik (*reverse transcription*) atau RT-PCR. Hal ini sesuai dengan pernyataan Majawati (2014) bahwa diagnosis laboratorium untuk infeksi Chikungunya adalah isolasi virus, deteksi antibodi oleh serodiagnosis, dan deteksi molekuler. Teknik molekuler berbasis PCR digunakan sebagai metode pilihan untuk diagnosis infeksi virus. PCR atau rantai reaksi polimerase adalah suatu metode untuk memperbanyak DNA spesifik dengan menggunakan enzim DNA polimerase yang stabil pada suhu tinggi dan sepasang primer yang melakukan hibridisasi pada bagian cetakan dari dua arah yang berlawanan.

*Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction* (RT-PCR) adalah teknik yang paling sensitif untuk mendeteksi virus RNA secara molekuler. Rantai RNA terlebih dahulu ditranskrip menjadi *complementary DNA* (cDNA) (Staples *et al.*, 2009). cDNA adalah DNA yang dibuat berdasarkan sekuen mRNA. Pembuatan cDNA melalui pemanfaatan enzim *reverse transcriptase* yang melakukan sintesis DNA dari template RNA (Herkilini *et al.*, 2017).

Pemeriksaan dengan RT-PCR digunakan untuk mendeteksi CHIKV secara spesifik disampel nyamuk ataupun klinis. RT-PCR dapat dibedakan menjadi dua metode yaitu *one-step* dan *two-step* RT PCR. Pada penelitian kali ini menggunakan metode *two-step* RT PCR dimana reaksi RT dan reaksi siklus PCR dilakukan secara terpisah (Staples, *et al.*, 2009).

Sampel nyamuk diambil dari daerah endemik Chikungunya tetapi tidak didapatkan hasil yang positif. Hal ini dapat disebabkan oleh nyamuk yang ditangkap tidak mengandung virus chikungunya ataupun infeksi yang rendah dalam tubuh nyamuk tersebut. Penelitian sebelumnya melaporkan bahwa dari 50 sampel yang diambil pada daerah yang terinfeksi Chikungunya, hanya ditemukan 13 sampel yang positif (Panggabean *et al.*, 2014). Kemungkinan hal ini disebabkan karena nyamuk yang terinfeksi Chikungunya justru tidak tertangkap atau nyamuk yang ditangkap dari lapangan merupakan nyamuk baru sehingga belum sempat mengisap darah dan kemungkinan besar tidak mengandung virus (Fadilla *et al.*, 2015). Salah satu faktor yang menyebabkan tidak terdeteksinya suatu virus yang ditransmisikan oleh nyamuk vektor adalah terjadinya degradasi RNA virus Chikungunya di dalam tubuh nyamuk (Sasmono *et al.* 2012). Namun, kemunculan virus Chikungunya bukanlah merupakan satu-satunya penyebab terjadinya KLB Chikungunya di suatu daerah karena mobilitas populasi yang tinggi juga diduga menjadi penyebab terjadinya suatu kasus penyakit

(Agustiningtyas & Lusiyana, 2017). Oleh sebab itu dalam penelitian ini kasus Chikungunya masih dapat terjadi meskipun CHIKV negatif.

## SIMPULAN

Berdasarkan deteksi molekuler menggunakan metode *two-step* RT PCR, Virus Chikungunya tidak terdeteksi pada sampel nyamuk *A. aegypti* asal wilayah Purwokerto Utara.

## DAFTAR REFERENSI

- Agustiningtyas, I. & Lusiyana, N. 2017. Ovitrap Survey and Serotype Identification of Dengue Virus on *Aedes* Sp Mosquito in Potorono, Banguntapan, Bantul, Indonesia. *International Journal of Mosquito Research*, 4(5), pp. 32-37.
- Caglioti, C., Lalle, E., Castilletti, C., Carletti, F., Capobianchi, M.R., & Bordi, L. 2013. Chikungunya Virus Infection: an overview. *New Microbiologica*, 36, pp. 211-227.
- Dinkes. 2012. *Data kasus Chikungunya di Kabupaten Gunungkidul*. Jawa Tengah : Dinas Kesehatan.
- DKK Banyumas. 2016. *Profil kesehatan banyumas tahun 2015*. Purwokerto : DKK Banyumas.
- Ekawasti, F. & Martindah, E. 2016. Pengendalian vektor pada penyakit zoonotik virus arbo di Indonesia. *Wartazoa*, 26(4), pp. 151-162.
- Fadilla, Z., Hadi, U. K., Setyaningsih, S. 2015. Bioekologi Vektor Demam Berdarah Dengue (DBD) serta Deteksi Virus Dengue pada *Aedes aegypti* (Linnaeus) dan *Ae. albopictus* (Skuse) (Diptera: Culicidae) di Kelurahan Endemik DBD Bantarjati, Kota Bogor. *Jurnal Entomologi Indonesia*, 12(1), pp. 31-38.
- Forman, S., Hungerford, N., Yamakawa, M., Yanase, T., Tsai, H.J., Joo, Y.S., Yang, D. K., Nha, J. J. 2008. Climate change impacts and risks for animal health in Asia. *Revue scientifique et technique*, 27(2), pp. 81-97.
- Hall, R., Blitvich, B., Cheryl, A. & Stuart, D., 2012. Advances in virus arbo surveillance, detection and diagnosis. *Journal of biomedicine and biotechnology*, 2012, pp. 1-2.
- Herkilini, A., Hendrati, P.M., Gumilas, N.S.A., Sulisty, H. 2017. Ekspresi mRNA BRLF1 Virus Epstein-Barr dari Biopsi Jaringan Tumor Formalin Fixed Paraffin Embedeed Sebagai Petanda Biologi Molekul Diagnosis Karsinoma Nasofaring. *Biosfera*, 34(3), pp. 138-143.
- Kemendes RI, 2012. *Pedoman Pengendalian Demam Chikungunya*. 2 ed. Jakarta: Kemendes RI.
- Macedo, G.A., de Araujo, J.M.G., Schatzmayr, H. G., Costa, F.A.C., de Filippisa, A.M.B., dos Santos, F.B., & Nogueira, R.M.R. 2013. Virological surveillance for early warning of dengue epidemics in the State of Rio de Janeiro, Brazil. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 107(3), pp. 141-146.
- Maha, M.S. & Subangkit. 2014. Manifestasi Klinis Infeksi Virus Chikungunya pada Kejadian Luar Biasa di Indonesia. *Jurnal Biotek Medisiana Indonesia*, 3(1), pp. 11-16.
- Mahmud, S., Ahmed, S.S., & Hussain, M. 2017. Chikungunya Fever: A Global Burden Including Bangladesh. *International Journal of Scientific Research*, 6(7), pp. 542-546.
- Majawati, E.S. 2014. Penggunaan *Polymerase Chain Reaction* (PCR) pada Diagnosis Filariasis. *Jurnal Kedokteran Meditek*, 15(39), pp. 1-8.
- Ochieng, C., Lutomiah, J., Makio, A., Koka, H., Chepkorir, E., Yalwala, S., Mutisya, J., Musila, L., Khamadi, S., & Richardson, J. 2013. Mosquito-borne arbovirus surveillance at selected sites in diverse ecological zones of Kenya. *Virology journal*, 10, p. 140.
- Panggabean, Y.C., Kusumawati, L.R., & Yulfi, H. 2014. Deteksi virus chikungunya pada nyamuk *Aedes aegypti* di kabupaten Serdang Bedagai. *The journal of medical school*, 47(1), pp.14-18.
- Sari, T.F., Joharina, A.S., Anggraeni, Y.M. 2012. *Identifikasi Serotipe Virus Dengue Pada Nyamuk Aedes Aegypti Dan Aedes Albopictus Di Kota Salatiga Dengan Metode RT-PCR*. Salatiga: Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Vektor dan Reservoir Penyakit Salatiga.
- Sasmono, T., Yohan, B., Setainingsih, T.Y., Aryati, W. P., & Rantam, F.A. 2012. Identifikasi Genotipe dan Karakterisasi Genome Virus Dengue di Indonesia untuk Penentuan Prototipe Virus Bahan Pembuatan Vaksin Dengue Berbasis Strain Indonesia. *Journal Kesehatan Indonesia*, 6, pp. 602-609.
- Schneider B.S. & Higgs, S. 2008. The enhancement of arbovirus transmission and disease by mosquito saliva is associated with modulation of the host immune response. *Transactions of the royal society of tropical medicine and hygiene*, 102, pp. 400-408.
- Staples, J.E., Breiman, R.F., & Powers, A.M. 2009. Chikungunya fever : an epidemiological review of a re-emerging infectious disease. *Clinical infectious diseases*, 49, pp. 942-948.