

MILIK
PERPUSTAKAAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA

**LAPORAN AKHIR
TAHUN ANGGARAN 2009**

610
61
59.160/10
han
r

**REKOMBINAN PROTEIN E VIRUS DENGUE
SUBTIPE BARU DAN KONVENSIONAL DENGAN
BACULOVIRUS SEBAGAI BAHAN VAKSIN KLON
SUBUNIT**

PROGRAM INSENTIF RISET DASAR

Bidang Fokus : Kesehatan dan Obat-obatan



**LEMBAGA PENELITIAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA
Kampus C UNAIR Jl. Mulyorejo Surabaya
Phone : (031)5992445-6, Fax : (031)5992445
November 2009**

LEMBAR PENGESAHAN

Judul Kegiatan/riset: REKOMBINAN PROTEIN E (*Envelop*) VIRUS DENGUE SUBTIPE BARU dan KONVENSIONAL DENGAN BACULOVIRUS SEBAGAI BAHAN VAKSIN KLON SUBUNIT

Fokus Bidang Penelitian :Teknologi Kesehatan dan Obat-obatan

Penelitian : *Baru*

Lokasi Penelitian : Laboratorim DHF, Laboratorium Tissue Culture, ITD Universitas Airlangga

| Keterangan Lambaga Pelaksana/ Pengelola Penelitian | |
|--|--|
| A. Lembaga Pelaksana Penelitian | |
| Nama Koordinator/Peneliti Utama | Prof. Dr. Fedik Abdul Rantam, Drh. |
| Nama Lembaga/Insitusi | Lembaga Penelitian Universitas Airlangga |
| Unit Organisasi | Laboratorium DHF, ITD, UNAIR |
| Alamat | Jl. Mulyorejo Surabaya |
| Telepon/Faksimil/ e-mail | 031-5992445/ fed-ar@unair.ac.id |
| B. Lembaga Lain Yang Terlibat | |
| Nama Koordinator | Prof. Soetjipto, dr., MS., Ph.D |
| Nama Lembaga | TDC- UNAIR |
| Unit Organisasi | Laboratorium Hepatitis ITD-UNAIR |
| Alamat | Jl. Mulyorejo Surabaya |
| Telepon/Faksimil/ e-mail | 031-5992445-6, tdrc-ua@rad.net.id |


Disetujui

Ketua Lembaga Penyakit Tropis
Universitas Airlangga



Dr. Nasronudin, dr., SpPD, K-PTI
NIP. 140 159 073

Koordinator/Peneliti Utama
Kegiatan



Prof. Dr. Fedik Abdul Rantam,
NIP 131 653 434

Ketua Lembaga Penelitian
Universitas Airlangga



Prof. Dr. Bambang Sektiari, L.
NIP. 131 837 004

KETERANGAN PENELITIAN

Judul Penelitian : REKOMBINAN PROTEIN E (*Envelop*) VIRUS DENGUE SUBTIPE BARU dan KONVENSIONAL DENGAN BACULOVIRUS SEBAGAI BAHAN VAKSIN KLON SUBUNIT

Peneliti Utama : Prof. Dr. Fedik Abdul Rantam, Drh.

Institusi Peneliti : Universitas Airlangga

Bidang Fokus : Kesehatan dan Obat-obatan

Tahun Pelaksanaan : 2009

Biaya : 185 juta rupiah

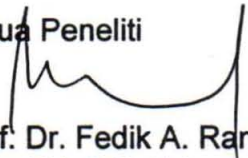
Tujuan : Mengkarakterisasi dan Memformulasikan protein E rekombinan sebagai bahan vaksin klon subunit virus dengue isolate lapang Indonesia

Sasaran Akhir Tahun : Produksi protein E rekombinan sebagai bahan vaksin klon subunit

Surabaya, 16 November 2009

Mengetahui
Ketua LPPM Unair

Prof. Dr. Bambang Sektiari L, DEA., Drh.
NIP. 131.837.004

Ketua Peneliti

Prof. Dr. Fedik A. Rantam
NIP. 131.653.434

Judul Kegiatan/Riset: REKOMBINAN PROTEIN E (*Envelop*) VIRUS DENGUE SUBTIPE BARU dan KONVENSIONAL DENGAN BACULOVIRUS SEBAGAI BAHAN VAKSIN KLON SUBUNIT

Fokus Bidang Penelitian : Teknologi Kesehatan dan Obat-obatan
Penelitian : Baru
Lokasi Penelitian : Laboratorim DHF, Laboratorium Tissue Culture, ITD Universitas Airlangga

RINGKASAN

Produksi protein E rekombinan berasal dari ligasi protein E dari semua strain virus dengue Den-1,2,3 dan Den-4. Keempat strain virus tersebut mempunyai TCID₅₀ = 10⁷. plasmid yang digunakan untuk transfeksi hadala pVL 11 kb. Hasil transfeksi pada *baculovirus* dalam sel acrophaga yang dibiakkan dengan médium penumbuh kemudian dimonitor ekspresi protein E dengan menggunakan uji indirect-ELISA.

Analisis produk protón recombinan dilakukan dengan SDS-PAGE kemudian dilakukan pemurnian dan ditentukan reaktifitas protein terhadap serum dari pasien DHF dengan menggunakan *western blot*. Fungsi protein yang bersifat antigenik tergantung dari model peptida dari protein yang diekspresikan oleh baculovirus. Protein poduk ekspresi setelah dilakukan analisis reaktifitas kemudian dilakukan purifikasi dan dianalisis toksisitas protein secara *in-vitro* dengan menggunakan sel BKH₂₁Clon₁₃, serta menggunakan mesenchymal sel.

Formulasi vaksin klon subunit didesain dengan model water in oil (W/O), adjuvant yang digunakan adalah montanied 70VG (SEPPIC) selanjutnya dilakukan homogenisasi dengan menggunakan *homogenizer* dengan kecepatan 4800 rpm. Setelah itu dilakukan analisis dengan menggunakan mikroskop untuk menentukan performance molekul dalam oil. Setelah itu diimunisasikan pada hewan coba *macaca fascicularis* (monyet ekor panjang).

Respon antibodi terhadap vaksin dianalisis dengan menggunakan *indirect ELISA* dan imunositokimia terhadap tingkat reaktifitas sel imun dengan menggunakan mikroskop fluoresen.

Hasil analisis virulensi dengan menggunakan kultur sel vero ditemukan 8 strain dari keempat serotype dan selanjutnya digunakan 4 strain yang terpilih sebagai bahan recombinan. Setelah dilakukan ligasi dan diinsert ke plasmid pVL dan ditransfeksikan ke baculovirus berdasarkan hasil elisa menunjukkan hasil signifikan terhadap titer antigen (protein) yang diekspresikan oleh *baculovirus*.

Analisis peptida dengan dua dimensi menunjukkan protein yang diekspresikan oleh baculovirus mempunyai sifat yang *fragmented* yang kompak sehingga diindikasikan mempunyai kemampuan induksi antibodi yang kuat. Hal ini terbukti setelah dilakukan purifikasi dan selanjutnya dilakukan analisis reaktifitas, menunjukkan bahwa protein E recombinan mempunyai sifat imunogenisitas yang tinggi.

Analisis kontaminan protein dari protein non spesifik menunjukkan tingkat kemurnian tinggi terlihat pada hasil scan densitometri yang divisualisasikan dengan densitas dan homogenisasi dari bentuk protein yang terdeteksi dengan scanning menunjukkan angka yang relatif tidak bervariasi.

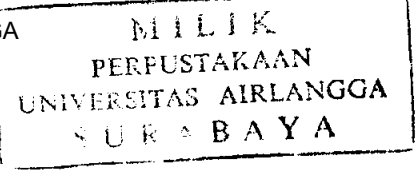
Analisis toksisitas protein sebagai bahan vaksin setelah dilakukan dengan menggunakan kultur sel menunjukkan bahwa protein tidak menginduksi sel menjadi nekrosis dan apoptosis terlihat pada hasil reaksi enzim dihydrogenase menunjukkan sel masih dalam tingkat normal yang masih mempunyai kemampuan untuk bereplikasi.

Analisis kontaminan bakteri dilakukan berdasarkan Standard Operasional (SOP) dari World Health Organisation (WHO) dilakukan isolasi dan identifikasi bakteri kontaminan dengan menanam pada media spesifik terhadap kuman patogen, dan hasilnya tidak ditemukan bakteri kontaminan. Protein hasil purifikasi digunakan sebagai bulk vaksin klon subunit. Kemudian dilakukan peneraan menggunakan spektrofotometri dengan panjang gelombang 650 nm. Jumlah partikel yang digunakan untuk vaksin adalah 10^7 per ml. Formulasi vaksin klon subunit dilakukan dengan cara mencampur partikel suspensi protein

dengan adjuvant yang sesuai dengan besarnya partikel protein yang diekspresikan pada supernatan.

Hasil uji coba vaksin pada hewan coba menunjukkan protein E rekombinan mempunyai sifat antigenitas dan imunogenitas yang tinggi. Walaupun masih memerlukan booster sehingga dapat terhindar dari antibody dependent enhancement (ADE) karena yang diinduksi tidak hanya antibodi humoral tetapi juga menginduksi kekebalan seluler.

Berdasarkan hasil uji coba pada hewan menunjukkan hasil signifikan terhadap potensi sebagai vaksin klon subunit. Untuk selanjutnya dalam uji coba pada manusia akan dilakukan oleh PT. Biofarma begitu juga formulasi untuk manusia yang sesuai dengan GMP dan standard WHO. Sehingga vaksin ini akan diproduksi secara masal.



DAFTAR ISI

| | Halaman |
|--|----------------|
| Lembar Pengesahan | i |
| Ringkasan | iii |
| Daftar Isi | vi |
| Pendahuluan | 1 |
| Metode Penelitian | 5 |
| Hasil Penelitian dan Pembahasan | 16 |
| Kesimpulan | 44 |
| Referensi | 45 |
| Penggunaan Dana Penelitian | 46 |

BAB I

PENDAHULUAN

Penyakit demam berdarah dengue (DBD) adalah penyakit yang merupakan masalah besar di Indonesia khususnya dan Negara tropis pada umumnya. Virus Dengue ternyata sudah mengalami perkembangan sifat baru, sehingga gejala yang ditimbulkan juga bervariasi mulai dari diarrhoe sampai dengan kebutaan sementara (Soedjoko, 2005). Hal ini terbukti dengan analisis secara kartografi menunjukkan sifat protein yang berbeda (Rantam, et al. 2009). Pencegahan dengan penyemprotan nyamuk (secara foging) masih sulit mengeliminasi penyakit ini, vaksinasi juga masih belum ditemukan yang sesuai dan dengan titer yang tinggi sehingga tidak mengakibatkan (*scunday antibody enhancmend*), dengan demikian protektif terhadap infeksi virus Dengue. Karena itu desain prototip vaksin sangat diperlukan dan harus sama (*matching*) dengan virus lapang. Saat ini virus Dengue diduga sudah mengalami perubahan sifat yang berdasarkan analisis molekuler terdapat sub tipe baru (Aryati, 2006), sehingga diperlukan karakterisasi molekuler yang nantinya digunakan sebagai bahan ligasi prototip lama dan baru dan akhirnya dapat terciptai bahan vaksin yang mempunyai sifat imunogen (Rantam, dkk. 2008).

Virus Dengue mempunyai sifat yang berbeda diantara keempat strain (DEN-1,-2,-3,-4). Perbedaan masing-masing strain secara empiris dalam penelitian adalah pada strategi replikasinya. Strain DEN-2 dan 3 relatif lebih cepat dibandingkan dengan strain DEN-1 dan 4. Strategi ini kemungkinan dipengaruhi oleh model reseptor yang dimiliki oleh masing-masing strain, sehingga pada *attachment* memerlukan waktu yang berbeda dalam penetrasi, dengan demikian akan menghambat proses replikasi virus.

Terdapat beberapa penelitian yang membuktikan adanya molekul yang mempunyai sifat *adheren* atau pengikatan diantara virus dan reseptor. Hal ini telah dibuktikan oleh kelompok Depres 1993, bahwa *aminoglycan* mempunyai peranan penting. Tetapi model dan komposisi dari reseptor masih belum jelas.

Selain itu juga implikasi yang ditimbulkan oleh masing-masing strain sedikit mempunyai kesamaan seperti strain DEN-2 dan 3 serta DEN-1, tetapi untuk strain DEN-4 berbeda. Hal ini kemungkinan daya virulensinya juga berbeda.

Patogenesis molekuler virus Dengue kemungkinan berkaitan sangat erat dengan respon imun pada awal infeksi seperti sitokin yang diekspresikan pada awal infeksi oleh monosit, sehingga terjadi komunikasi sistem imun seperti komplemen dan interleukin-2. Proses ini dapat mengakibatkan implikasi yang fatal mulai dari dengue fever (DF), dengue haemorrhagic fever (DHF) dan dengue shock syndrome (DSS). Yang kemungkinan mengakibatkan kerusakan pada sel endotel. Kejadian ini kemungkinan diawali adanya kerusakan sel endotel akibat replikasi dan translasi yang cepat, sehingga virus dengue mengalami proses pematangan menjadi partikel infeksius juga semakin cepat. Tetapi kecepatan sel infeksi juga tergantung pada reseptor sel target.

Patogenesis infeksi virus Dengue sampai sekarang baru sedikit diketahui dan tidak banyak informasi tentang dasar-dasar molekuler tentang pengikatan virus Dengue pada target sel. Penginfeksi virus pada beberapa sel dapat terjadi karena adanya perlekatan virus pada FC domain antibodi mediator imun seperti monosit mengekspresikan Fc-receptor (Porterfield, 1986). Selain hal di atas juga sulit diterangkan infeksi primer pada pasien tanpa antibodi Dengue atau penginfeksi sel tanpa Fc-reseptor (He, 1995). Untuk menguak hal tersebut sekarang banyak hasil penelitian menunjukkan, bahwa interaksi antara reseptor dengan protein envelope virus Dengue dan sel target merupakan dasar molekuler yang kuat. Hal ini sangat penting untuk mengetahui potensial infektivitas interaksi tersebut (Chen, *et.al.*, 1996).

Pengujian pengikatan protein envelope virus Dengue dengan imunhistokimia pada sel kultur menunjukkan adanya ikatan extraseluler pada permukaan sel. Seperti *glycosamine glycans* (GAGS) biasanya diekspresikan dalam matrik seperti sel membran yang digunakan oleh mikroorganisme lain untuk mengikat pada sel target (Rostand and Esko, 1997). Komposisi kimia spesifik yang digunakan pengikatan protein envelop virus dengue dengan target sel adalah heparan sulfat. Semakin tinggi pensulfatan heparan sulfat dan

polysulfonate sangat efektif untuk mencegah infeksi virus Dengue pada sel target. Hal ini menunjukkan, bahwa interaksi protein envelop dan sel target adalah benar-benar merupakan *critical determinant of infectivity* (Chen, *et al.* 1997). Sifat pengikatan diatas nampaknya tidak sama terhadap sel target satu dengan lainnya, walaupun memang protein envelop memegang peranan dalam menentukan daya infektivitasnya. Seperti ikatan reseptor sel dan intraendosomal. begitu juga penelitian (Anderson *et al.*,1992), bahwa protein envelop dari virus DEN-4 pada permukaan sel berkaitan dengan kepekaan infeksi vrus. Tetapi virulensinya akan berubah atau bervariasi jika ada induksi mutasi pada protein ini.

Adanya variasi pengikatan antara sel resptor dan sel target sangat tergantung dari jenis sel yang diinfeksi, hal ini terbukti, bahwa tingkat pengikatan pada sel target antara sel vero dan sel hepatoma berbeda dan disini menunjukkan sel hepatoma lebih pekah dibanding sel vero (Marienneau, *et.al.* 1996).

Pencegahan infeksi virus Dengue sampai saat ini masih belum ditemukan model vaksin yang sesuai karena virus Dengue juga mempunyai virulensi yang berbeda yang mengandung protein imunogenik yang berbeda pula, serta ditemukan suptipe baru, karena itu pendekatan vaksin dengan menciptakan protein yang bersifat polivalen merupakan jalan keluar yang terbaik sebagai bahan vaksin klon subunit dengan mengeksplorasi molekuler virus Dengue subtype baru, selanjutnya diciptakan prototip kombinasi gen yang menginduksi protein antigenic dan imunogen dengan sistem baculovirus. Hal ini merupakan kelanjutan prototip lama Institute of Tropical Disease (ITD) dikombinasi dengan subtype baru. Karena itu rencana penelitian ini adalah membuat prototip vaksin virus Dengue yang mengenali keempat serotipe dan sub tipe baru sehingga vaksin ini mempunyai sifat yang polivalen, dengan demikian akan dapat menetralisasi infeksi virus Dengue. melalui respons antibodi humoral dan seluler secara sistemik. Oleh karena itu tujuan penelitian ini adalah menemukan protein envelop (E) baru yang sesuai dengan sel target, dan mempunyai sifat antigenik, maka kemungkinan dapat dikarakterisasi sifat imunogeniknya, sehingga dapat digunakan sebagai bahan vaksin klon subunit virus dengue isolate lapang

Indonesia dan akhirnya sebagai vaksin dengue pertama di Indonesia yang dapat diujikan dilapangan yang diakhiri dengan produksi vaksin klon subunit terhadap virus dengue

Sifat Dengue Virus

Virus dengue termasuk flavivirus penyebab demam akut atau flue like syndrome sampai pada dengue shock syndrom (DSS) ternyata yang berperanan penting adalah protein struktural karena molekul tersebut sebagai salah satu faktor penyebab penyakit menjadi berat walaupun respons imun juga berperanan penting dalam manifestasi penyakit tersebut. Tetapi mekanisme yang pasti masih belum jelas walaupun mekanisme imunologi dan faktor virus menjadi penentu beratnya penyakit.

Setiap serotipe tidak mempunyai sifat protektif silang, begitu juga ditambah dengan sifat sitokin, interferon dan komplement dimungkinkan berpartisipasi terhadap terjadinya sifat permeabilitas pembuluh darah perifer yang akhirnya terjadi DHF.

Berdasarkan filogenetik studi bahwa virus dengue (DEN-2) yang native mempunyai kesamaan dengan negara negara di Asia Tenggara, begitu juga di negara peru dan cuba bahwa sekunder infeksi menjadi penentu 75% sakit DHF. Virus single stranded RNA mengandung single open reading yang mengkode precursor polipeptida yang melipat dengan daerah yang nontranslasi proteolytic cleavage. Virus yang tersusun tiga protein struktural (C, M dan E) serta 7 macam protein nonstruktural (NS1, NS2a, NS2b, NS3, NS4a, NS4b dan NS5) ternyata patogenitas tergantung dari protein E atau gen yang terlokalisasi di genome protein E. Hal ini terbukti dengan adanya pasase pada sel kulture menjadi lemah ketika sifat protein E berubah yang ditandai adanya perubahan asam amino yang sangat memungkinkan terjadi asosiasi dengan sifat virulensi virus (Laytmeyer et al. 1999). Berdasarkan sifat tersebut penciptaan prototip vaksin klon subunit menjadi penting sebagai bahan vaksin klon subunit isolat lapang.

BAB II

METODOLOGI PENELITIAN

Penelitian ini dilaksanakan selama 2 tahun, dilaksanakan di laboratorium DHF, Lab. Tissue Culture, Lab Biologi Molekuler Veteriner FKH - Unair. Adapun rincian program-programnya dan metode yang digunakan adalah sebagai berikut

2.1. Virus dan Isolasi

Sampel virus merupakan hasil isolasi dari pasien yang sakit DBD di berbagai rumah sakit di beberapa provinsi di Indonesia yang merupakan isolat Lab. Dengue ITD-Unair. Virus ini diisolasi setelah dilakukan skrining dengan menggunakan semi nested PCR dengan menggunakan sel C6/36 p27 berasal dari Kobe University Jepang dan diperbanyak dengan menggunakan sel Vero dari Freie Universitaet -Berlin, Germany.

2.2. Serum

Koleksi serum sampel diambil dari pasien DBD (Demam Berdarah Dengue) dengan derajat sakit yang berbeda dari yang akut sampai sembuh dari DBD yang dikelompokan berdasarkan kriteria WHO. Pengkoleksian sampel serum ini dilakukan sejak tahun 1997 sampai saat ini dari berbagai rumah sakit di Indonesia. Serum yang terkoleksi digunakan untuk uji reaktifitas, uji identifikasi sifat protein yang menginduksi antibodi netralisir dan yang stabil yang selanjutnya di gunakan sebagai dasar eksplorasi gen pengkode protein imunogen yang spesifik terhadap protein E.

Cara pengkoleksiannya adalah darah dari pasien kemudian dipisahkan serumnya dengan mensentrifugasi 1700 rpm pada temperatur 10°C selama 10 menit kemudian dimasukkan pada cryotube 1,8 ml untuk selanjutnya disimpan dalam freezer dengan temperatur -84°C atau langsung digunakan penelitian. Serum ini digunakan setelah virus teridentifikasi dengan menggunakan RT-PCR untuk menentukan atrain virus DEN-1 sampai dengan DEN-4.

2.3. Identifikasi Virus Dengue Strain Lapang

2.3. a. Semi nested RT- PCR dan Multiplex RT-PCR

Pada penelitian ini menggunakan dua metode untuk amplifikasi selain menggunakan two step RT-PCR juga menggunakan One step Multiplex RT-PCR. arena virus ini mempunyai krosreaksi yang kuat diantara strain virus Dengue, maka untuk menentukan strain virus Dengue tidak dapat dilakukan dengan uji HI (*Haemaagglutination Inhibition test*) dan uji ELISA. Oleh karena itu metode yang tepat untuk menentukan strain virus ini adalah multiplex RT-PCR (Rantam, *et al.* 2008) sebagai pengganti *semi-nested PCR* metode (Henchal *et al.*, 1991, Lanciotti *et al.*, 1992) dengan beberapa modifikasi.

Tab. 2.1. Primers yang digunakan identifikasi strain virus Dengue.

| p | Sequence | Genom position | Size in bp. Of amplified DNA product |
|-----|------------------------------------|----------------|--------------------------------------|
| D1 | 5'TCAATATGCTGAAACGCGCGAGAAACCG-3' | 134-161 | 5 1 1 |
| D2 | 5'TTGACCAACAGTCAATGTCTTCAGGTTTC-3' | 616-644 | 5 1 1 |
| T1 | 5'-CGTCTCAGTGATCCGGGGG-3' | 568-586 | 482 (D1 and TS1) |
| TS2 | 5'-CGCCACAAGGGCCATGAACAG-3' | 232-252 | 119 (D1 and TS2) |
| TS3 | 5'-TAACATCATCATGAGACAGAGC-3' | 400-421 | 290 (D1 and TS3) |
| TS4 | 5'-CTCTGTTGTCTTAACAAGAGA-3' | 506-527 | 392 (D1 and TS4) |

Tahap 1. Ekstraksi RNA

Ekstraksi RNA menggunakan larutan Trizol. 60 μ l supernatan hasil isolasi virus dari biakan sel atau serum sampel dari pasien dan ditambahkan 190 μ l DW kemudian ditambahkan larutan Trizol 750 μ l yang kemudian dicampur dengan pemipetan berkali-kali dan diinkubasikan beberapa menit pada temperatur ruangan. Selanjutnya ditambahkan 200 μ l Chloroform dan dibiarkan pada temperatur ruangan dan disentrifuse 12.000 rpm selama 15 menit pada 4°C.

Supernatannya diambil kemudian ditambahkan 500 μ l propanol-2 dilakukan vortex dan dibiarkan pada temperatur ruangan selama 10 menit. Setelah di sentrifugasi selama 10 menit supernatan di buang kemudian ditambahkan 1 ml ethanol 70% dan di vortex. Pada fase ini sampai dapat di simpan atau dilanjutkan dengan disentrifugasi 12.000 rpm kemudian supernatan dibuang dan dilakukan pengeringan dengan vaccum pump selama 10 menit. Pellet di suspensikan dengan 10 μ l DW. Selanjutnya digunakan untuk amplifikasi. Ekstraksi RNA selain menggunakan TRIZOL juga menggunakan kit isolasi RNA (Invitrogen).

Tahap 2. First round PCR

5 μ l cDNA dari RT-PCR dalam tube eppendorf 0,5 ml kemudian ditambah 76 μ l DW, 8 μ l dNTPs mix, 9 μ l 10x Tth buffer, 0,5 μ l primer D-1 (320 ng/ μ l) dan 0,5 μ l primer D-2 (320 ng/ μ l) kemudian dipanaskan pada temperatur 94°C selama 5 menit. Sebelum ditambah 1 μ l Tag DNA polymerase (2U/ μ l) dilakukan spindown kemudian dilakukan pemipetan selanjutnya ditambahkan 100 μ l mineral oil dan akhirnya dilakukan proses PCR sebanyak 35 siklus, 94°C selama 1 menit untuk denaturasi, 53°C selama 1,5 menit untuk annealing 72°C selama 2 menit untuk extension. Setelah berakhir sampel dibiarkan pada suhu 72°C selama 10 menit.

Tahap 3 Second round PCR

5 μ l dari produk first round PCR dalam eppendorf 0,5 ml diencerkan 20 μ l dan selanjutnya diambil 5 μ l dimasukkan ke tube eppendorf 0,5 ml ditambahkan 72 μ l DW, 2 μ l dNTPs mix, 10 μ l 10x Tth buffer, 2 μ l primer D-1 (320 ng/ μ l), 2 μ l primer TS-1 (320 ng/ μ l), 2 μ l primer TS-2 (320 ng/ μ l), 2 μ l primer TS-3 (320 ng/ μ l), 2 μ l primer TS-4 (320 ng/ μ l).

Setelah dipanaskan 94°C selama 5 menit dilakukan spindown kemudian ditambah 1 μ l Tag DNA polymerase (2U/ μ l) selanjutnya dipipet dan ditambah 100 μ l mineral oil. Kemudian dilakukan proses PCR sebanyak 25 siklus. Hasil PCR divisualisasikan dengan agarose elektroforesis dengan agarose 4% yang mengandung 1 ug/ml ethidium bromide dengan marker O X174 RF DNA/Hae III Fragments, Gibco BRL./ 100 bp DNA Leader (invitrogen)

2.3.b. One Step Multiplex RT-PCR

Metode ini selain digunakan untuk sekering serotipe virus dengue juga digunakan untuk produksi cDNA untuk sekuensing. Caranya yaitu dengan menggunakan kit superscript III one step RT PCR kemudian ditambahkan primers model Lanciotti dan atau primers spesifik protein E. Selanjutnya dilakukan amplifikasi dengan menggunakan 55°C selama 30 men untuk reverse transcriptase, 94°C 3 men untuk predenaturasi 94°C selama 30 det untuk denaturasi, 56°C 45 det untuk annealing, 72°C 1 men untuk ekstensi dan 60°C 7 men untuk *shocking*, proses amplifikasi ini dijalankan sebanyak 40 siklus.

2.4. Analisis RNA dengan agarose gel elektroforesis

RNA atau DNA yang diamplifikasi dipisahkan dengan 1% agarose gel dan selanjutnya di analisis dengan bantuan transluminator (UNIQUEIP) dengan panjang gelombang 302 nm. Dan selanjutnya dokumentasi dilakukan pemotretan dengan kamera digital atau geldoc (Kodak)

Untuk memastikan kualitas ekstraksi RNA dilakukan penilaian dengan cara gelelektroforesis. 2 μ g isolate RNA kemudian ditambahkan 18 μ l sampel buffer, selanjutnya ditambahkan 2 μ l ethidium bromid kemudian diinkubasikan pada temperatur 65°C selama 10 menit. Setelah itu 2 μ l dimasukan kedalam buffer

sampel dan akhirnya di lakukan runing dengan 40 volt . akhirnya dilakukan amplifikasi jika hasilnya baik sesuai dengan keperluan 5-10 ug dan hasilnya dokumentasi, dan atau dilakukan purifikasi untuk sekuensing.

2.5. Perbanyak dan Virulensi Virus

Isolate virus dengue yang diisolasi dari pasien setelah diidentifikasi strain virus selanjutnya dilakukan perbanyak, untuk mempersiapkan analisis sifat virus termasuk stabilitas serta virulensi virus sebagai bahan eksplorasi genetic sebagai bahan rekombinan.

Caranya adalah dengan menginokulas virus pada sel vero selanjutnya dilakukan pasase dan bersamaan denga itu dilkaukan analisis virulensi virus dengan cara mencara TCID 50. Pertama virus diinokulasikan pada sel 100 ul pada petridish 5 cm kemudian diberi medium DMEM yang mengandung 10% FBS atau FCS serta antibiotic penstrep, dan fungizone. Selanjutnya diinkubasikan pada incubator 37oC selama 4 hari dimana setiap hari diamati apakah terbentuk cytopathogenic effect (CPE) atau tidak. Hal ini dilakukan pasase sampai membentuk CPE 80%, dengan cara memberikan trypsin 0,05% untuk melepaskan sel dan selajutnya ditumbuhkan kembali agar virus yang belum matang dapat berkembang dengan cepat dengan demikian produksi antigen semakin meningkat. Selain itu juga dilakukan bland pasase dengan cara mengambii 200 ul supernatant dari medium kemudian diinokulaikan pada sel yang telah tumbuh 80% dan selanjutnya diinkubasikan pada incubator seperti diatas. Jika virus telah mencapai CPE 80% selanjutnya dilakukan uji TCID50 untuk mentuk menentukan tingkat virulensi dan stabilitas virus sebagai bahan rekombinan. Bersamaan dengan itu dilakukan perbanyak baculovirus yang dilakukan secara parallel (Rantam, et al, 2003).

2.6. Tissue Culture Infectious Dose 50

Pada uji ini jika kemampuan virus untuk menginfeksi 90% dalam 4 hari maka virus tersebut digunakan sebagai kandidat untuk bahan rekombinan. Caranya adalah pertama dengan melakukan delusi suspensi virus dilakukan sampai pada

pengenceran 10⁻⁹/ml. Kemudian virus diinokulasikan pada sel yang ditumbuhkan pada microplate 24 well. Dengan cara membuang medium kemudian diinokulasikan sebanyak 100 ul dari masing-masing pengenceran, dan selanjutnya diinkubasikan selama 1 jam kemudian baru diberi medium penumbuh DMEM komplet yang mengandung ovarly (gel) dan akhirnya di beri kode dan diinkubasikan pada inkubator Co2 dengan temperatur 37oC selama 4 hari. Akhirnya ditentukan CPE plaque. Dengan cara mewarnai dengan methylen blue dan selanjutnya dilakukan penghitungan CPE dibawah mikroskop inverted dengan pembesaran 10x

2.7. Karakterisasi genom strain virus dengue dan protein E

Tahapan ini digunakan untuk menganalisis kompleks genome yang diawali dengan pemurnian produk PCR. Metode yang digunakan untuk pemurnian produk PCR baik untuk analisi genom setiap strain maupun analisis genom untuk protein E adalah dengan sequencing yang diawali dengan pemurnian produk PCR.

2.7.1. Primer spesifik protein E

Primer yang digunakan untuk mencari genom yang menginduksi protein E antara lain:

Tabel 3.2. Primers protein E

| Primer position | Sequence | Genom |
|-----------------|-----------------------------|------------|
| P857 | 5'-GCCCATACAGGCACT-3' | 857- 1025 |
| P1025 | 5'-TTAGCCATGGTAGTCAC-3' | 857- 1474 |
| P1474 | 5'-GGTGAGCATTCTAGC-3' | 857- 1819 |
| P1819 | 5'-TCCACTTCCACATTTGAG-3' | |
| P1709 | 5'-CATACAGCACTGACAGGAGC-3' | |
| P1819 | 5'-GCACATTGCATAGCTC-3' | 1709- 1819 |
| P2450 | 5'-TCCACTTCCACATTTGAG-3' | 1709- 2450 |
| DEN-1 F | 5'-CATGCGGTGCGTGGGAATAGG-3' | 1-1484 |

| | | |
|---------|--|--------|
| DEN-2 F | 3'-ATCTCATTAAGTCTAGCCCTGTT-5' 5'-AACAGAAGCCAAACAGCCT-3' | 1-1484 |
| DEN-3 F | 3'-TATTTTTGTCTTCGGTTTGTCG-5' 5'-AATGAGATGTGTGGGAGTAGGAAA-3' | 1-1478 |
| DEN-4 F | 3'-CCAAGTGCACCACGAGCTCG-5' 5'-AGACACCCATGCAGTAGGAAAT-3' | 1-1478 |
| | 3'-AGTAACTGTTTCTCTACCGTCTTT-5' | |

Selanjutnya untuk amplifikasi sama seperti pada identifikasi serotype atau one step multiplex RT-PCR Lailla *et al.* 1991, Mauneean *et al.* 1993, Kumaira *et al.* 2003, Cakravathia *et al.* 2006, Miagostovich *et al.* 1997). Dan akhirnya dilakukan visualisasi dengan agarose gel elektroforesis 2%.

2.8. Perbanyak rekombinan baculovirus

Perbanyak dilakukan dengan sistem kultur sel yang ditumbuhkan pada flash volume 75 ml kemudian diinkubasikan pada inkubator pada suhu 28°C. Kepadatan sel awal adalah $2,5 \times 10^5$ /ml. Kemudian dilakukan infeksi dengan rekombinan baculovirus dosisnya adalah 1 PFU/ sel, dan kemudian sel atau supernatan dipanen dari media kultur selanjutnya dilakukan sentrifugasi dengan kecepatan 5000 rpm selama 10 menit. Akhirnya supernatan dipisahkan sedang pelet dilakukan resuspensi kembali dengan perbandingan 1:1 lalu disonikasi akhirnya dilakukan sentrifugasi kembali dengan kecepatan yang sama supernatan dikoleksi untuk tahap berikutnya.

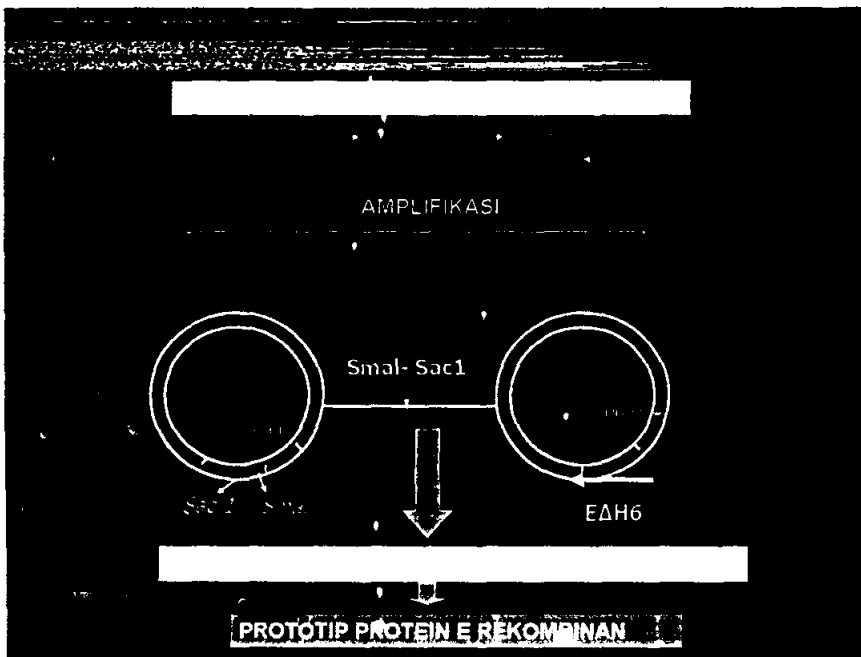
2.9. Desain Prototip Rekombinan

DNA manipulasi dan konstruksi plasmid, Semua manipulasi DNA dan konstruksi plasmid dilakukan sesuai dengan standard protokol Sanbrook *et al.* (1989). Plasmid yang digunakan pada penelitian ini adalah pVL dengan berat molekul 11.000 bp. Fragment dari plasmid mengandung DH6 α untuk propagasi. Selanjutnya dilakukan insert gen yang dikehendaki dari fragment gen protein E yang dipotong dengan enzyme restriksi *Alu1*, *Hinf III*, sesuai dengan strain virus.

Selanjutnya dilakukan ligasi dengan gen pengkode protein E yang conserve dan pengkode sifat epitop imunogen, setelah itu dilakukan transfeksi/fusi gen pada baculovirus. Konstruksi selengkapnya seperti pada Gambar di bawah.

2.9.1 Fusion Gen Protein E

Setelah dilakukan purifikasi dari produk restriksi protein E dengan menggunakan beberapa enzim restriksi difusikan dengan plasmid PVL dengan menggunakan vektor Sma1-Sc1 dan ditransfeksikan dengan baculovirus, kemudian dikultur dengan sel achrophaga. Setelah terlihat adanya CPE 90% dilakukan panen dan selanjutnya protein Edipurifikasi sebagai bahan imunogen.



Gambar 2.1. Sekema fusi gen untuk rekombinan protein E virus dengue dengan baculovirus system

Setelah dilakukan ligasi dengan gen baculovirus selanjutnya dikembangkan dengan menggunakan sel AcNPV yang diinkubasikan pada temperatur 28oC selama 4 sampai dengan 5 hari dan selanjutnya dilakukan identifikasi pertumbuhan virus dan spesifisitas protein E. Virus yang tumbuh dalam sel selalu ditandai adanya bentuk sel yang mengalami pembesaran dan adanya

sitopatik efek, dan terkadang membentuk sel giant. Hal ini menandakan virus berkembang dengan baik. Tetapi terkadang pertumbuhan sel tidak homogen dan morfologi juga berbeda karena itu ciri ini menandakan virus tidak tumbuh dengan baik. Tetapi untuk meningkatkan produksi protein dilakukan dengan penyiapan sel yang homogen dan 2 kali pasasi sehingga semua sel siap sebagai hospes replikasi virus. Untuk analisis homogenitas tersebut di atas, maka diperlukan identifikasi dengan imunofluoresen assay. (Rantam et al. 2002)

2.10. Karakterisasi protein E rekombinan

Analisis antigenik protein E rekombinan dilakukan karakterisasi reaktifitas dengan cara imunoblotting. Tahap pertama adalah dilakukan SDS-PAGE menggunakan prosentasi gel 12% Selanjutnya dilakukan transblot pada membran nitrocelulosa dan selanjutnya direaksikan dengan menggunakan serum poliklonal dari pasien DHF dan juga dengan menggunakan serum dari kelinci hasil imunisasi dari whole virus Dengue dari keempat serotipe virus Dengue. Serum yang digunakan untuk uji rekatifitas adalah serum yang mempunyai titer 1/10.000. sehingga dapat menunjukkan pita (band) yang jelas (Rantam, 2003).

2.11. Purifikasi protein

Sel Sf9 yang diinfeksi dengan rekombinan baculovirus selanjutnya di panen dan dicuci dengan buffer sodium phospat (pH 7,4), dan kemudian diresuspensikan dalam buffer lysis (50 mM NaH₂PO₄, pH 8,0, 300 ml mM NaCl, dan 1% Igepal CA-630) selanjutnya disonikasi dengan menggunakan pelapis es selama 30 detik. Fraksi terlarut dan yang tidak dipisahkan dengan cara sentrifugasi selama 15 menit pada kecepatan 12.000 rpm. Pellet yang tidak terlarut diresuspensikan dengan menggunakan laemml sample buffer, sedang protein dipisahkan dengan menggunakan elektroelusi dan akhirnya protein yang murni dihitung dengan cara

bradford protein assay atau tingkat kepadatan dihitung dengan spektrofometer dengan Cubit (Rantam, 2003)

2.12. Desain Vaksin

Setelah dilakukan purifikasi selanjutnya digunakan untuk formulasi vaksin dengan cara menggunakan adjuvant dengan perbandingan 7:3 atau 70% adjuvant dan 10 % antigen/protein dan 20% H₂O. Selanjutnya dilakukan homogenisasi dan selanjutnya dianalisis dengan menggunakan mikroskop inverted. Jika molekul homogen dalam adjuvant selanjutnya dilakukan uji toksisitas dan besarnya molekul yang terbentuk dalam oil adjuvant. Adjuvant yang digunakan adalah Montaneid-SEPPIC. Adjuvant ini dengan sifat hydrophylic yang dominan yang digunakan spesifik virus flavi. Setelah dilakukan packing dalam botol yang spesifik untuk vaksin kemudian dilakukan uji kontaminan sehingga dalam animal trial dapat menghasilkan yang titer antibodi sesuai dengan sifat antigenitas molekul dalam vaksin.

2.13. Uji Kontaminan

Uji ini digunakan untuk evaluasi sifat antigenitas molekul dalam vaksin sehingga tidak terpengaruh terhadap molekul dari agent patogen lainnya. Caranya yaitu dengan melakukan streak pada nutrient agar selanjutnya dilakukan inkubasi pada inkubator 37°C selama 3 hari kemudian dilakukan identifikasi secara makroskopis, jika tidak ditemukan koloni maka dinilai steril. Selanjutnya dilakukan uji toksisitas pada sel kulture mesenchymal yang sangat sensitif (Rantam et al. 2009)

2.12. Uji toksisitas

Uji toksisitas dilakukan dengan menggunakan kultur sel mesenchyme karena sel ini sangat sensitif jika dibandingkan dengan sel BGHK21 clon13. Caranya yaitu sel mesenchymal pasase ke 2 selanjutnya ditanam pada 96 well dan setiap well mengandung 10³ kemudian dibiakan selama 3 hari yang menunjukkan sel

tumbuh 70% selanjutnya dilakukan pencucian dan kemudian ditambahkan medium 150 ul yang mengandung protein dengan pengenceran secara berseri. Sel diinkubasikan pada inkubator CO2 5% dengan temperatur 37oC. Kemudian dianalisis dengan menggunakan MTT dan dianalisis dengan ELISA reader dengan panjang gelombang 650 nm

2.13. Hewan coba

Hewan coba yang digunakan adalah kelinci jenis New Zealand berumur 2,5 bulan dan mencit balb/C berumur 2,5 bulan. Setelah dilakukan imunisasi dengan dosis 0,5 ml pada mencit dan 1 ml pada kelinci selanjutnya setiap minggu dilakukan monitoring respons imun humoral dan seluler. Penentuan respons imun humoral ditentukan dengan indirek ELISA. Dan *flow cytometri* untuk selular.

2.14. Uji Field trial pada Manusia (volunteer)

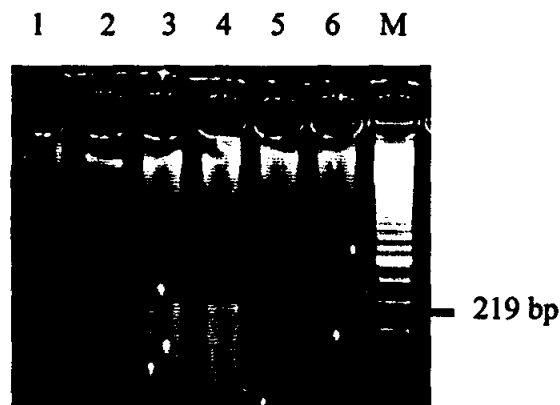
Uji ini dilakukan oleh Biofarma- Bandung

BAB III HASIL PENELITIAN

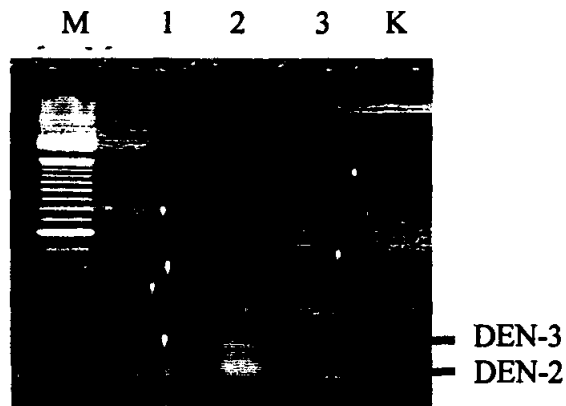
Hasil kemajuan penelitian pada tahap pertama masih difokuskan pada pembuatan atau formulasi vaksin yang baik dengan ukuran derajat homogenisasi partikel protein, dan juga pemilihan adjuvant yang mempunyai sifat long acting sehingga terhindar dari efek *antibody dependent enhancement* (ADE).

1. Sekrining Isolate Virus Dengue baru

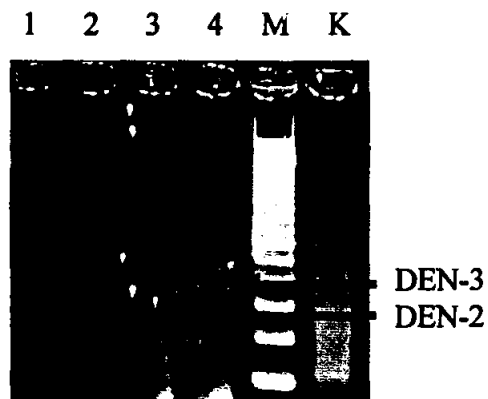
Setelah dilakukan skreening sampel dengan menggunakan semi nested RT-PCR ditemukan 240 virus yang bervariasi strainnya. Strain DEN-1 ditemukan kebanyakan dari daerah Kalimantan, Sulawesi, sedang DEN-4 dari Jawa tengah, Den-2 dari Jawa Timur dan Sumatra, Bali dan DEN 3 dari Jawa Barat. Tetapi sifat virus dan stabilitas virus tidak ditentukan berdasarkan daerah. Adanya variasi isolate menjadi sangat penting untuk menentukan isolate yang baik untuk seed vaksin. Hasil skreening virus yang telah dilakukan identifikasi dengan multiplex/semi nested RT-PCR telah dilakukan perbanyakan dan dilakukan karakterisasi biologis dengan kultur sel vero, ternyata hasil masing-masing virus walaupun serotipenya sama tetapi mempunyai sifat virulensi yang berbeda.



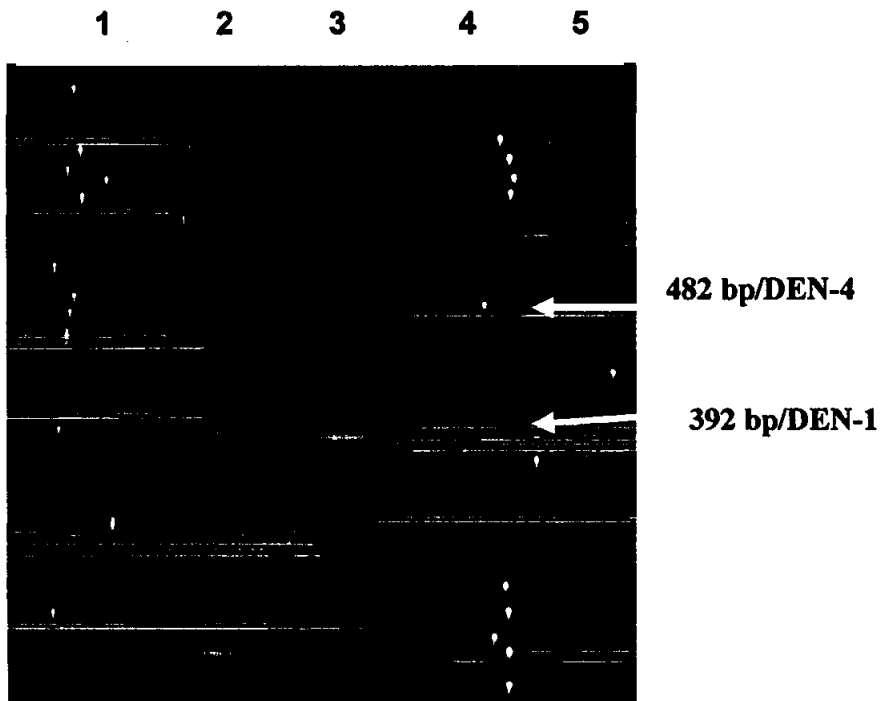
Gambar 3. 1. Skrining dan identifikasi serotype virus dengue dengan semi nested RT-PCR sample yang berasal dari serum pasien DHF dengan berbagai macam simptom



Gambar 3.2. Sekrining dan identifikasi serotype virus dengue dengan one step multiplex RT-PCR dari sample serum berasal dari pasien dengue dengan berbagai macam simptom



Gambar 3.3. Sekrining dan identifikasi serotype virus dengue dari PBMCs pasien dengue dengan berbagai macam symptom.



Gambar 3.4. Sekrining dan identifikasi serotype virus dengue dengan one step multiplex RT-PCR dari sample serum berasal dari pasien dengue dengan berbagai macam simptom. Lajur 1; Den-4, lajur 2 dan 3: DEN-1 Lajur 4: kontrol negatif dari sel vero, dan lajur 5: chikungunya

Setelah dilakukan identifikasi dengan menggunakan multiplex RT-PCR menunjukkan bahwa serotype dengue yang menginfeksi pada anak kebanyakan terjadi infeksi campuran DEN-2 dan DEN-3. Hal ini berbeda dengan serotype virus dengue yang menginfeksi pada orang dewasa seperti pada tabel 3.2.

Tabel. 3.1. Serotype virus dengue yang menginfeksi pada anak

PROFIL SAMPEL DAN SEROTIPE VIRUS VIRUS DENGUE PADA ANAK

| No. Sampel | Nama | Umur (th) | Diagnosa | Tipe |
|------------|------|-----------|-----------|-------------|
| 3 | nn | 7 | DF gr III | |
| 4 | nn | 6 | DF | Den-3 |
| 5 | nn | 4 | DF | Den-2 Den-3 |
| 6 | nn | 3 | DF | Den-2 Den-3 |
| 7 | nn | 6 | DF | |
| 8 | nn | 5 | DF | Den-2 Den-3 |
| 9 | nn | 8 | DHF gr I | Den-2 Den-3 |
| 10 | nn | 5 | DF | Den-2 Den-3 |
| 11 | nn | 7 | DF | Den-2 Den-3 |

Tabel.3.2. serotipe virus dengue yang menginfeksi pada orang dewasa

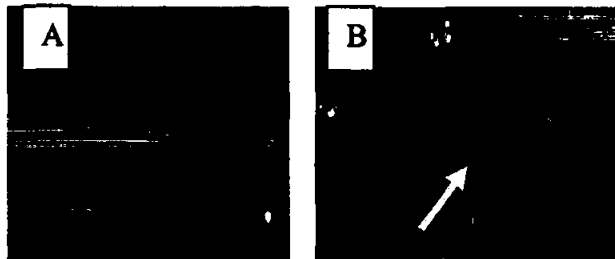
PROFIL SAMPEL DAN SEROTIPE VIRUS VIRUS DENGUE PADA ORANG DEWASA

| | | | | |
|----|----|----|--|-------|
| 54 | nn | 28 | | Den-2 |
| 55 | nn | 37 | | Den-2 |
| 56 | nn | 19 | | Den-2 |
| 57 | nn | 28 | | (-) |
| 59 | nn | 30 | | Den-2 |
| 60 | nn | 32 | | Den-2 |
| 61 | nn | 20 | | Den-2 |
| 62 | nn | 34 | | Den-2 |
| 63 | nn | 39 | | Den-2 |

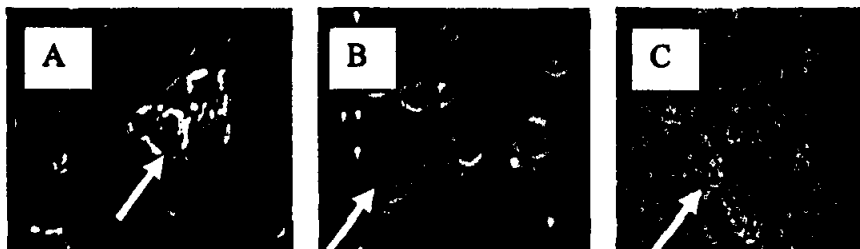
Pada tabel 3.2. menunjukkan bahwa terdapat perbedaan model infeksi virus pada anak dan orang dewasa. Fenomena ini kemungkinan dapat digunakan sebagai indikator bahwa virus dengue yang menginfeksi pada anak berakibat fatal jika tidak dilakukan tatalaksana yang baik. Hal karena infeksi pada anak kebanyakan adalah infeksi campuran. Sedang pada orang dewasa sering mengindikasikan bahwa jika terserang DEN-2 kebanyakan akan terjadi implikasi klinis yang cukup berat. Seperti shock DHF dsb.

2. Karakterisasi Biologis Virus Dengue

Pada tahapan ini digunakan untuk memastikan jenis virus dengue yang mempunyai perbedaan virulensi dengan menggunakan sel vero dengan indikator adanya pembentukan CPE/ *plaque forming unit* (PFU) dan *focus forming unit* (FFU). Hasilnya mengindikasikan bahwa setiap serotipe virus mempunyai sifat virulensinya berbeda, begitu juga yang menjadi fokus tahapan ini adalah sifat virulensi berbeda juga terjadi pada serotype yang sama terutama serotipe 2 dan serotipe 3.

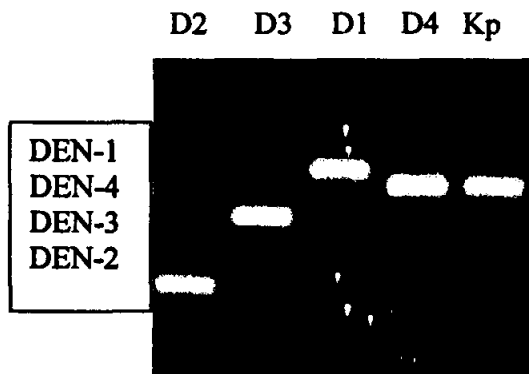


Gambar. 3.4. Karakterisasi biologis pada sel vero pasase 3 yang telah diinokulasi dengan sample serum pasien pada gambar A sel vero normal sedang B awal terjadinya CPE pada sel vero



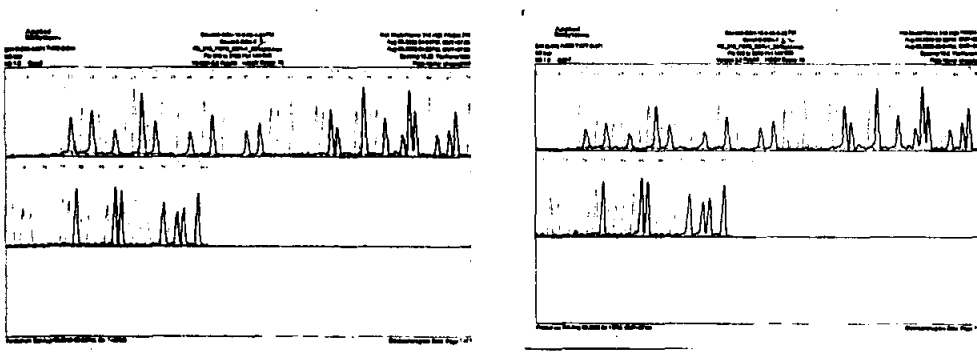
Gambar 3.5. Bentukan PFU pada sel vero yang telah diinokulasi dengan sample serum pasien DBD, menunjukkan adanya perubahan dari sel mulai dari (A) CPE terjadi 3 hari setelah diinokulasi sample , (B). Sel yang mengalami CPE, (C). Sel mengalami agregasi atau giant cells.

Sel yang telah mengalami CPE 90 % selanjutnya dilakukan identifikasi serotype dengan one step multiplex RT-PCR. Hasilnya menunjukkan bahwa preparasi sample mempunyai arti penting dalam penyiapan sekuensing untuk analisis kekerabatan.

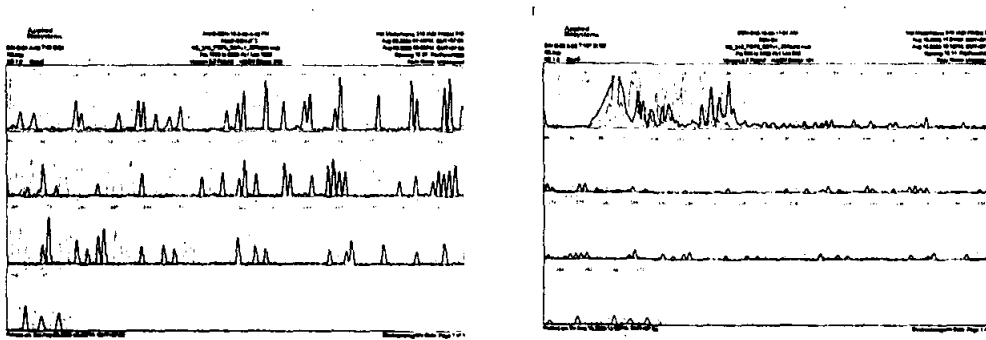


Gambar 3.6. analisis one step multiplex RT-PCR spesifik protein E , Kp: Kontrol positif

Produk PCR yang telah dilakukan identifikasi selanjutnya dilakukan pemurnian untuk selanjutnya digunakan analisis nukleotida dengan cara skuensing ABI PRISM 310



Gambar 3.7. Hasil skuensing virus Dengue serotip 1 dan serotype 2



Gambar 3.8. Hasil skuensing virus Dengue serotip 3 dan serotipe 4.

Analisis homologi dari beberapa isolate menunjukkan adanya beberapa virus mempunyai sifat yang kemungkinan berbeda dengan yang lain. Hal ini kemungkinan terjadi insersi beberapa nukleotida yang mengindikasikan virus tersebut telah menginfeksi beberapa hospes yang berbeda. Sehingga menunjukkan adanya sifat moderat yang nantinya dengan harapan dapat mempunyai daya imunogenitas pada semua serotipe virus dengue. Di bawah salah satu contoh homologi DEN-2 dari berbagai daerah di Indonesia

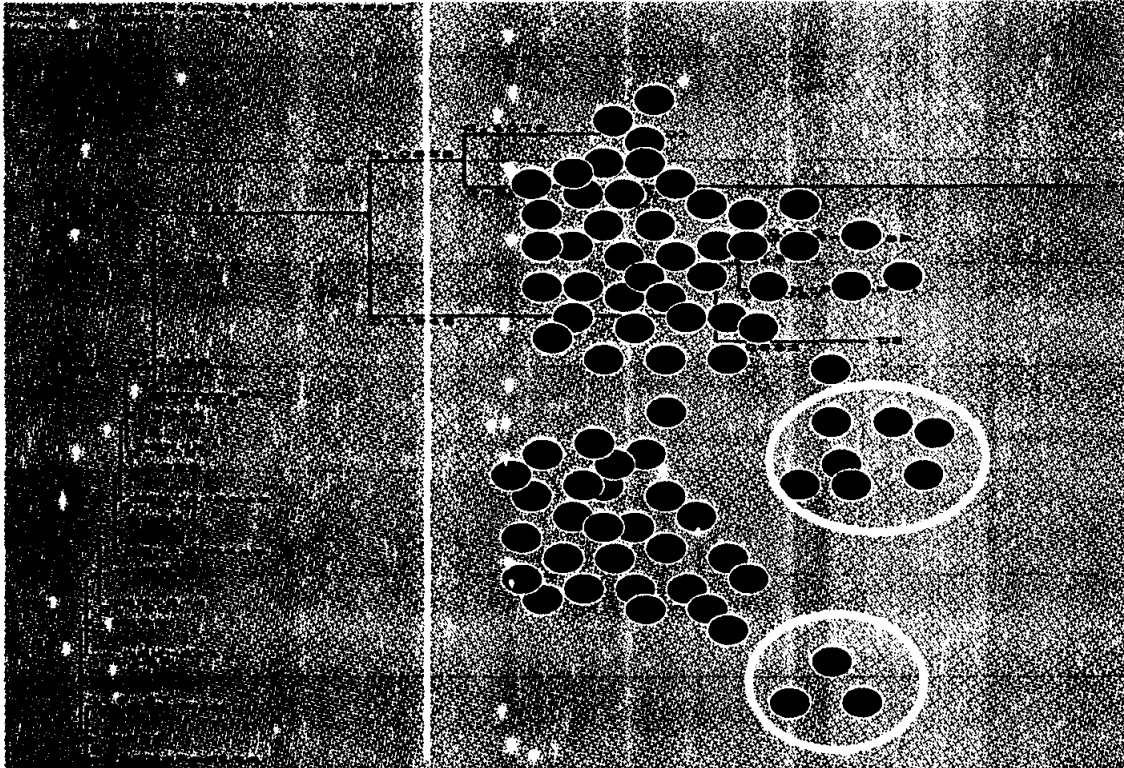
Tab. 3.3. Analisis homologi

| Kode | Sby 1 | Sby 2 | Slo | Pc | Jbr | Bli 1 | Bli 2 | Bd | Bp 1 | Bp 2 | M1 | Mk | Md | Pc | Jk 1 | Jk 2 | US | Jm |
|-------|-------|-------|------|------|------|-------|-------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| Sby 1 | 100 | 98,2 | 99,5 | 80,5 | 87,6 | 78,8 | 76,8 | 80,1 | 68,8 | 63,3 | 86,0 | 87,9 | 83,7 | 82,3 | 67,3 | 88,7 | 44,8 | 52,7 |
| Sby 2 | 95,0 | 100 | 99,0 | 83,4 | 87,3 | 79,9 | 77,5 | 78,1 | 76,7 | 78,4 | 95,3 | 85,3 | 74,9 | 85,5 | 62,3 | 89,3 | 44,5 | 68,3 |
| Slo | 97,2 | 98 | 100 | 80,7 | 84,4 | 77,8 | 78,1 | 77,9 | 73,9 | 70,6 | 95,7 | 90,6 | 77,6 | 84,6 | 72,4 | 85,6 | 49,6 | 62,3 |
| Pc1 | 82,3 | 85,0 | 83,6 | 100 | 82,7 | 78,8 | 79,8 | 73,8 | 81,4 | 76,7 | 83,5 | 89,8 | 76,6 | 97,8 | 70,3 | 82,9 | 48,7 | 56,6 |
| Jbr1 | 80,2 | 88,8 | 87,9 | 87,7 | 100 | 70,7 | 70,5 | 78,9 | 78,3 | 56,0 | 87,2 | 88,9 | 78,7 | 96,8 | 10,0 | 99,8 | 69,1 | 46,3 |

| | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-------------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| BI1 | 52,3 | 78,7 | 78,9 | 78,8 | 83,6 | 100 | 99,3 | 98,6 | 79,0 | 75,0 | 70,6 | 80,9 | 75,4 | 75,1 | 50,8 | 80,3 | 70,2 | 67,7 |
| BI2 | 55,6 | 79,8 | 80,9 | 73,9 | 86,6 | 98,5 | 100 | 99,0 | 80,9 | 81,2 | 70,6 | 78,4 | 72,5 | 74,3 | 51,9 | 83,3 | 69,2 | 70,2 |
| Bdg | 56,2 | 68,7 | 80,0 | 63,0 | 99,8 | 97,8 | 95,0 | 100 | 88,5 | 88,7 | 71,8 | 88,5 | 67,6 | 88,9 | 50,5 | 68,7 | 53,4 | 61,3 |
| Bp1 | 53,3 | 67,9 | 80,9 | 69,8 | 73,4 | 74,9 | 70,3 | 99,0 | 100 | 99,5 | 70,5 | 85,6 | 66,7 | 76,6 | 71,2 | 70,4 | 44,5 | 58,1 |
| Bp2 | 55,0 | 77,5 | 73,6 | 71,3 | 73,9 | 78,8 | 72,4 | 98,7 | 99,8 | 100 | 70,6 | 82,3 | 63,3 | 70,3 | 72,2 | 68,3 | 48,9 | 52,3 |
| M1 | 83,3 | 99,8 | 96,8 | 78,8 | 81,2 | 87,0 | 80,2 | 86,0 | 48,5 | 49,7 | 100 | 95,0 | 68,9 | 80,3 | 54,8 | 78,2 | 60,0 | 73,3 |
| Mks | 85,2 | 97,0 | 95,5 | 79,9 | 82,0 | 86,1 | 83,0 | 85,1 | 52,3 | 56,8 | 97,0 | 100 | 76,9 | 81,2 | 52,3 | 80,3 | 61,2 | 70,0 |
| Mdn | 82,3 | 98,1 | 97,9 | 86,7 | 86,0 | 87,9 | 85,0 | 89,9 | 54,2 | 53,9 | 98,0 | 98,0 | 100 | 80,9 | 53,8 | 83,4 | 60,3 | 71,0 |
| Pc2 | 61,2 | 85,6 | 76,8 | 69,8 | 98,6 | 78,8 | 68,6 | 75,8 | 47,9 | 49,4 | 82,3 | 74,5 | 73,6 | 100 | 61,7 | 85,0 | 45,5 | 53,8 |
| JK1 | 53,2 | 89,7 | 63,4 | 67,8 | 70,8 | 68,9 | 70,6 | 66,9 | 68,4 | 66,9 | 52,3 | 83,3 | 84,5 | 78,2 | 100 | 84,1 | 44,9 | 49,0 |
| JK2 | 52,0 | 89,2 | 80,9 | 83,4 | 68,8 | 71,2 | 68,7 | 70,2 | 53,4 | 54,7 | 56,4 | 82,6 | 83,3 | 77,3 | 99,6 | 100 | 46,0 | 46,4 |
| USA | 72,0 | 65,5 | 77,5 | 78,6 | 44,3 | 73,3 | 45,3 | 72,3 | 50,5 | 51,5 | 60,0 | 61,0 | 63,4 | 54,0 | 53,8 | 48,1 | 100 | 73,3 |
| Jmca | 68,2 | 65,8 | 78,8 | 79,4 | 56,6 | 57,3 | 55,6 | 47,3 | 51,6 | 51,9 | 63,3 | 68,9 | 67,8 | 62,1 | 53,6 | 60,1 | 69,6 | 100 |

sampai dengan tipe 4 hal ini menunjukkan adanya hubungan kekerabatan yang jelas diantara tipe sehingga diperlukan analisis profil antigenesitas sehingga didapatkan serotipe virus dengue yang sangat mengenali serotipe lainnya.

Analisis profil antigen virus Dengue isolate lapang



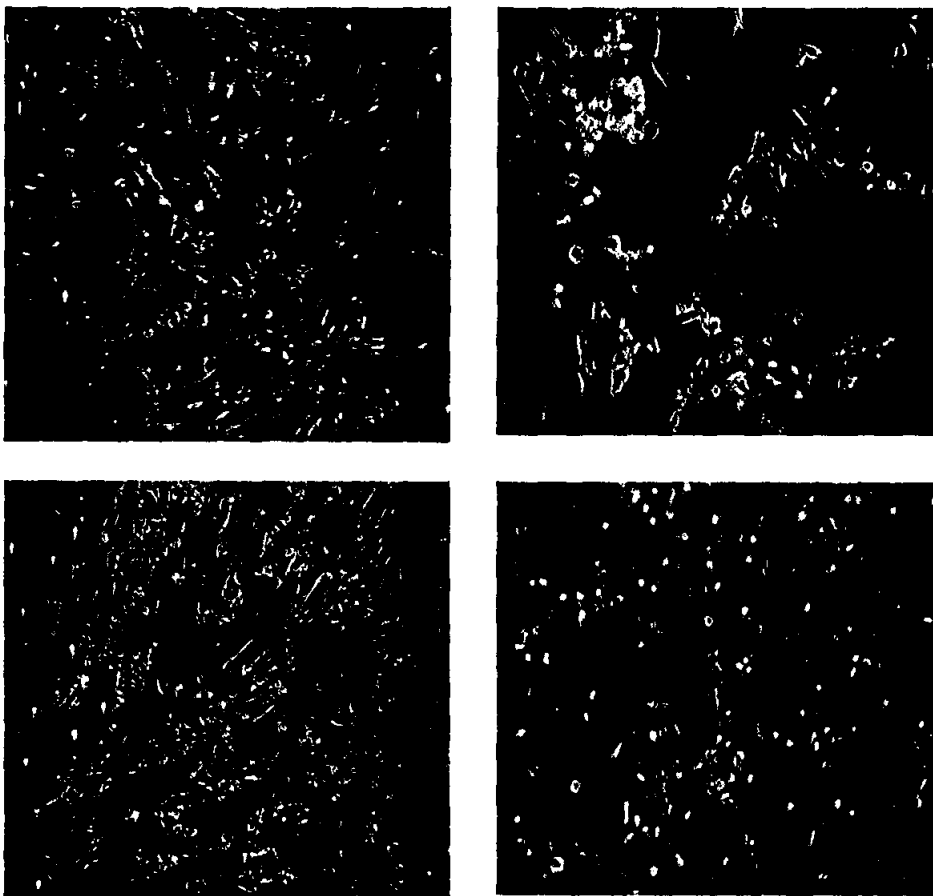
Gambar 3.10. analisis profil antigenesitas dengan cartography untuk menentukan serotipe virus dengue yang mempunyai hubungan kekerabatan dan sifat antigenitas yang dapat mengenali semua serotipe.

Berdasar pada Gambar 3.10 menunjukkan bahwa sifat kekerabatan diatas virus dengue mempunyai variant baru yang mempunyai sifat kesamaan antigen dan juga beberapa variant mempunyai sifat yang berbeda. Variant baru yang banyak dijumpai adalah berasal dari virus DEN-3 yang kemudian diikuti oleh DEN-2. Hal ini menunjukkan bahwa kinetik molekul virus dengue (DEN-3) mempunyai sifat yang relatif lebih progresiv dibandingkan dengan Den-2 dan DEN-1, DEN-4. Selain itu juga terdapat beberapa variant yang mempunyai kesamaan antigenitas

sangat dekat dengan serotipe lainnya, sehingga serotipe ini sangat sesuai untuk dikembangkan menjadi bahan vaksin karena mengenali semua serotipe.

3. Persiapan virus sebagai bahan rekombinan

Virus Dengue yang merupakan seed bahan vaksin untuk rekombinan di perbanyak dengan menggunakan sel vero. Untuk menentukan tingkat virulensi virus dengan melakukan pengamatan terbentuknya cytopathogenic effect (CPE). Hasilnya dapat dilihat seperti gambar 3.1.

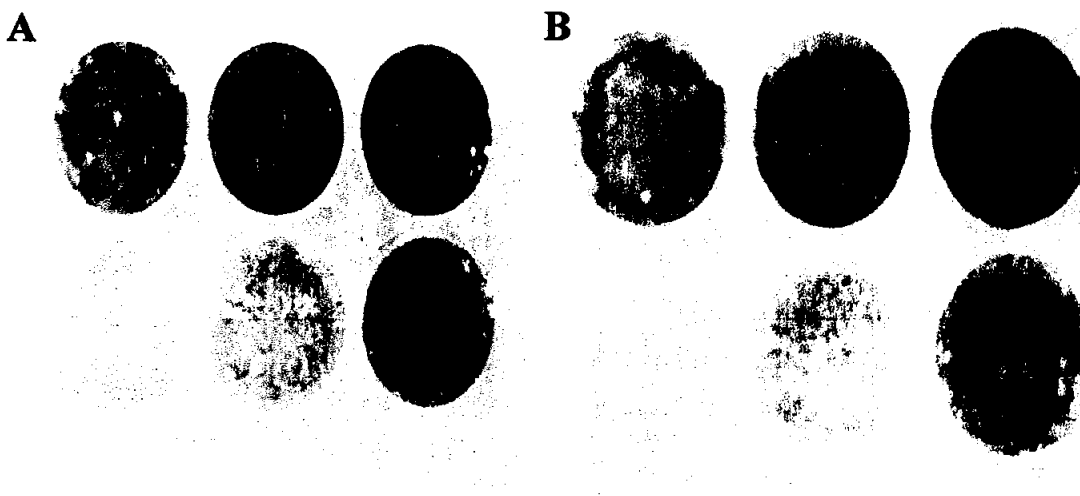


Gambar 3.1. Virus dengue dari ke empat strain/ serotipe diperbanyak pada sel vero sampai pada pasase 12. sel yang terinfeksi tampak ada perubahan morfologi sel menjadi bulat dengan dinding yang tidak merata. A. Virus Dengue

serotipe 1, b. Virus Dengue serotipe 2, c. Virus Dengue serotipe 3, dan d. Virus Dengue serotip 4.

4. Penentuan TCID₅₀

Selain hasil diatas juga dilakukan peneraan jumlah partikel virus pada sel berdasarkan tingkat virulensinya dilakukan analisis tissue culture infectious dose 50 (TCID₅₀). Hal ini penting dilakukan untuk mengukur tingkat kematangan virus dan virulensinya. Hasilnya dapat dilihat seperti pada Gambar 3.2. di bawah ini.

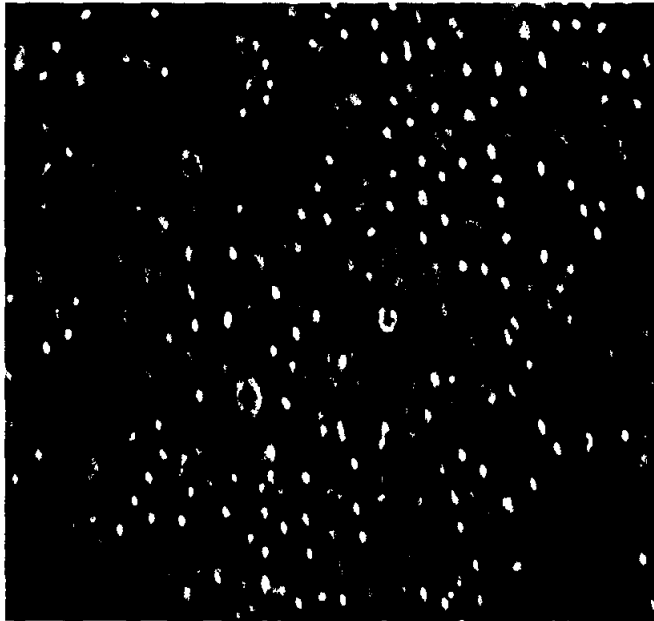


Gambar 3.2. Sel vero yang diinfeksi virus Dengue dengan pengenceran secara serial. Hal ini dilakukan semua serotipe virus dengue. Contoh A. Virus Dengue serotipe 2, B. Virus Dengue serotipe 3.

5. Transfeksi dan Produksi Protein E Rekombinan

Setelah dilakukan transfeksi selanjutnya baculovirus yang ditransfeksi dengan plasmid yang mengandung gen protein E selanjutnya di inkubasikan pada inkubator 37oC dengan CO₂ 5% selanjutnya dilakukan secara continue dan supernatan di panen dan

dilakukan purifikasi untuk bahan vaksin. Protein tersebut dilakukan pemurnian dengan cara pengikatan menggunakan tallon. Sel yang banyak mengandung virus terlihat spesifik pada gambar menunjukkan bahwa sel tersebut mengekspresikan protein. Gambar dapat dilihat seperti di bawah.

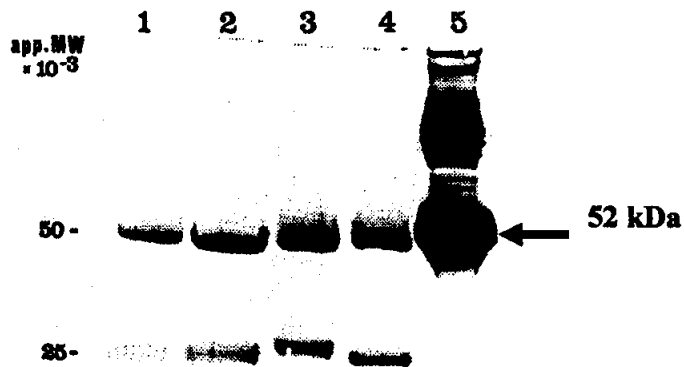


Gambar 3.11. Produk rekombinan baculovirus dan protein E pada sel acrophaga (AcNPV) yang telah diinkubasikan pada temperature 28°C

Pertumbuhan virus dan sel pada rekombinan sistem baculovirus dapat dilihat pada morfologi sel. Hasil diatas menunjukkan bahwa rekombinan diatas kurang optimal, sehingga diperlukan optimalisasi. Sehingga akan didapatkan jumlah protein yang memadai. Hal ini dapat diperbaiki dengan cara mengembangkan sel yang homogen sehingga mature dalam suporting virus untuk bereplikasi.

6. Karakterisasi Protein

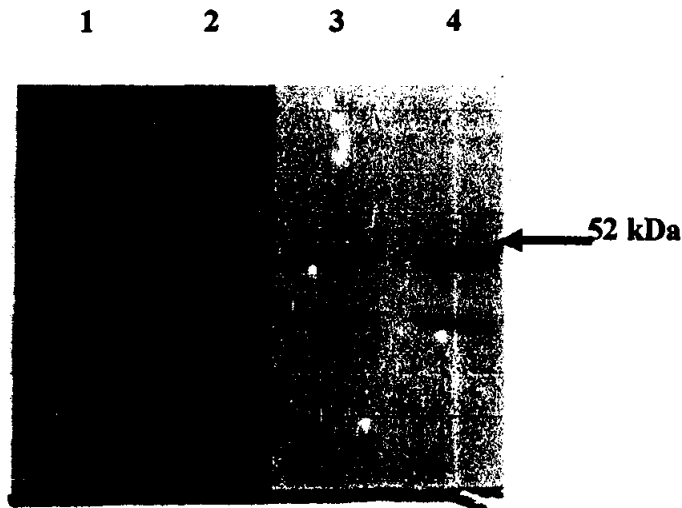
Hasil purifikasi protein E rekombinan selanjutnya dilakukann analisis menggunakan SDS-PAGE dan selanjutnya dilakukann uji reaktifitas menggunakan imunobloting.



Gambar 3.12. Hasil analisis protein E rekombinan dengan menggunakan SDS-PAGE 12% yang divisualisasikan dengan commasiie blue. Lajur 1-4 : protein E rekombinan, lajur 5: Marker protein.

2. Immunobloting

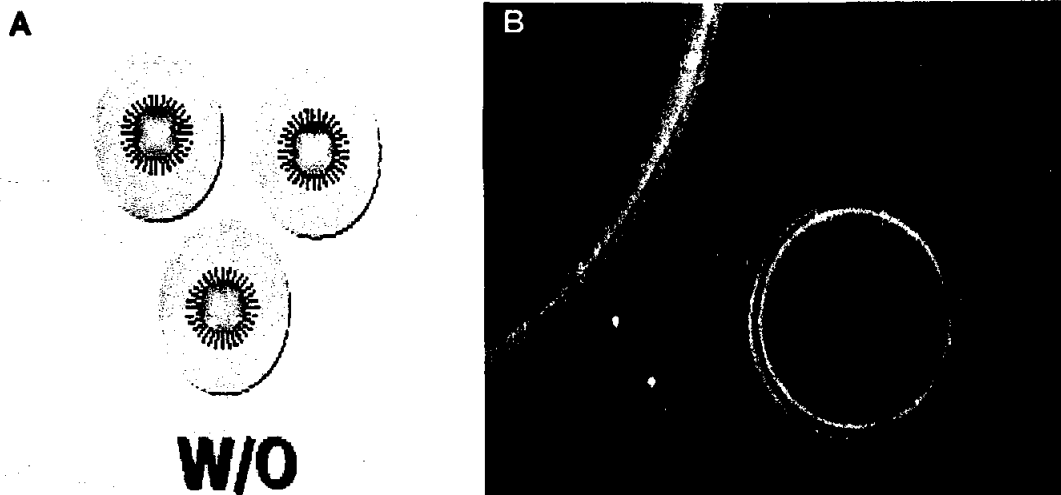
Protein E produk rekombinan dilakukan analisis reaktifitasnya dengan menggunakan westernblot. Setelah protein ditransfer dan kemudian direaksikan dengan antibody poliklonal dari serum pasien DHF dan serum dari kelinci menunjukkan reaktifitas yang cukup tinggi terlihat adanya pita yang terbentuk menunjukkan adanya ikatan antara antigen dan antibody. Hasilnya dapat dilihat pada gambar 3.3 dibawah.



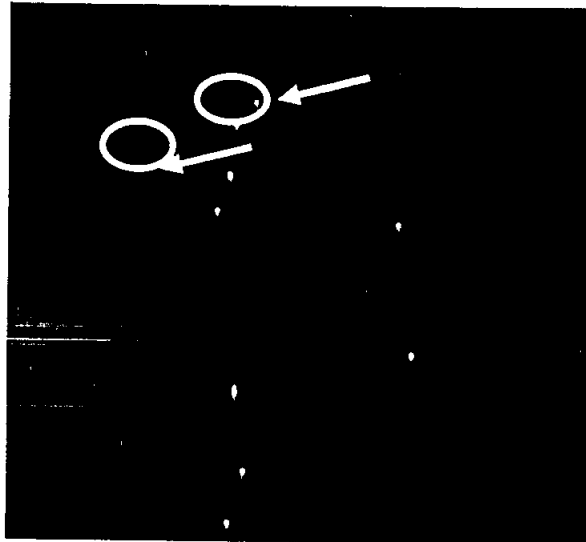
Gambar 3.13. Analisis protein dengan menggunakan dengan western blot protein E rekombinan yang direaksikan dengan serum poliklonal dari pasien DHF yang divisualisasikan dengan Fast Red. (Metode Rantam, et al. 2001)

3. Formulasi vaksin

Setelah dilakukan pencampuran antara antigen dan adjuvant dan selanjutnya diamati dengan mikroskop menunjukkan tingkat homogenisasi yang cukup seperti pada gambar 3.4. di bawah. Walaupun demikian masih ditemukan adanya partikel yang berukuran besar sehingga perlu dipertimbangan hasilnya dapat dilihat pada gambar 3.5. di bawah ini.



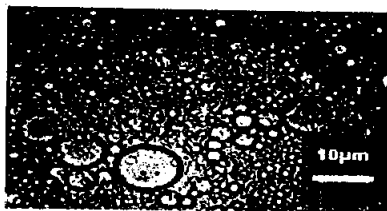
Gambar 3.14. Analisis homogenisasi antara adjuvant dan partikel protein E rekombinan. A. Desain adjuvant dengan molekul protein E rekombinan, B. Hasil homogenisasi yang dianalisis dengan mikroskop inventid. Hasil pada panah menunjukkan homogen diantara partikel setelah dilakukan homogenisasi. Sedang bila ditemukan adanya partikel dalam water in oil menunjukkan adanya ukuran partikel yang hetrogen sehingga tidak bias digunakan untuk imunisasi.



Gambar 3.15 Hasil analisis dengan mikroskop inverted pembesaran 40 X menunjukkan adanya partikel dalam water in oil , seperti pada lingkaran menunjukkan adanya ukuran partikel yang heterogen sehingga tidak bisa digunakan untuk imunisasi. Tanda lingkaran menunjukkan adanya partikel yang berukuran besar.

MONTANIDE ISA
Vaccines adjuvants

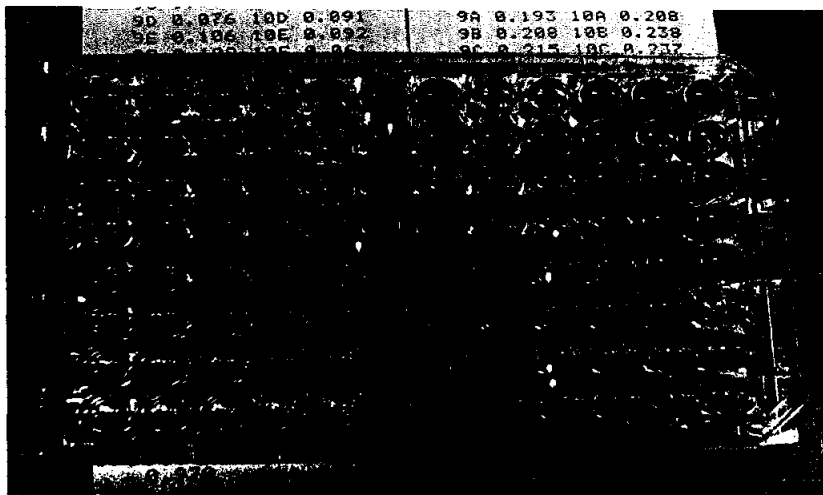
1. Microscopic aspect



Gambar 3.16. Analisis homogenisasi dengan mikroskop menunjukkan adanya partikel yang berukuran merata dan homogen menunjukkan adanya penyatuan antara partikel protein dan adjuvant sehingga dapat menginduksi antibody yang baik dan protektif. A. Standar homogenisasi dari SEPPIC , B. Menunjukkan partikel yang mempunyai ukuran sama sehingga dapat disimpulkan bahwa vaksin ini mempunyai daya induksi yang baik sebagai vaksin klon subunit.

4. Uji Biokompatibilitas

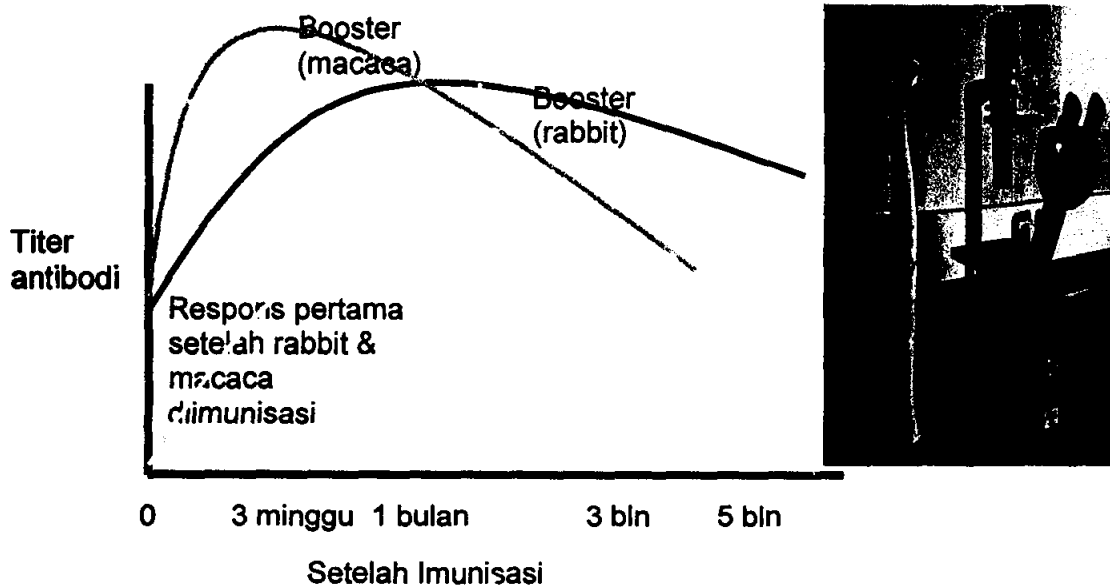
Setelah dilakukan analisis uji biokompatibilitas dengan menggunakan sel mesencymal menunjukkan bahwa setelah dilakukan homogenisasi antara protein dan adjuvant kemudian dipaparkan pada sel pada pasase 3 menunjukkan tidak adanya kelainan morfologi dan kelainan secara internal. Hal ini terlihat pada uji MTT yang tidak terpengaruh terhadap level dehidrogenase yang disekresikan. Hasilnya seperti di bawah ini. Begitu juga pada uji kontaminan terhadap bakteri patogen tidak ditemukan koloni yang tumbuh.



Gambar. 3.17. Hasil uji biokompatibilitas dengan menggunakan sel mesencymal yang dianalisis dengan metode MTT. 1. Warna biru menunjukkan sekresi hidrogenase dan warnah jernih menunjukkan pengeblokan sekresi dehidrogenase.

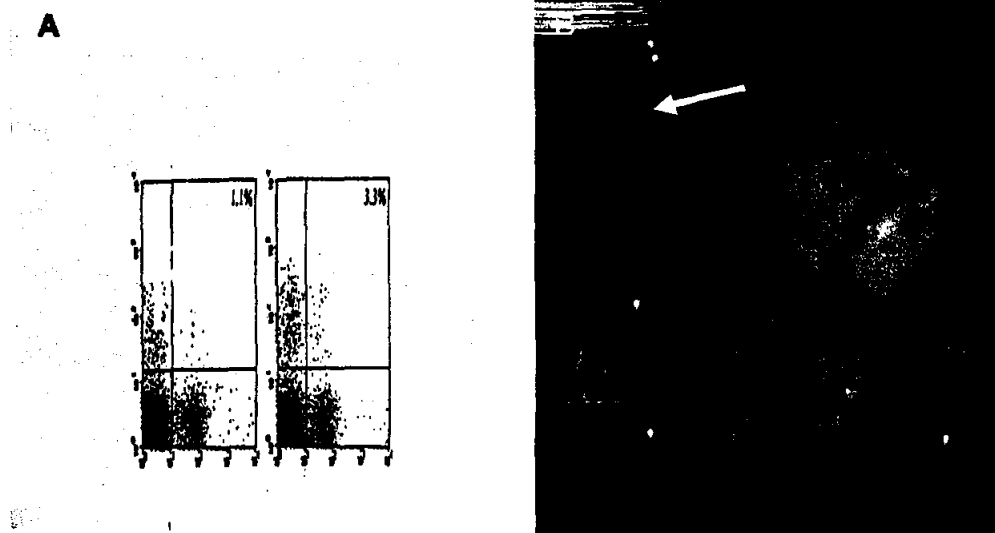
5. Respons antibodi

Profil respons antibodi yang diinduksi hasil vaksinasi dari beberapa hewan coba menunjukkan respons yang berbeda, pada macaca setelah dilakukan booster telah menunjukkan respons yang sangat cepat sekresi imunoglobulin, jika dibandingkan dengan hewan lain seperti pada kelinci, dan terlihat pada vaksinasi pertama terlihat kesamaan profil respons antara macaca dan kelinci.



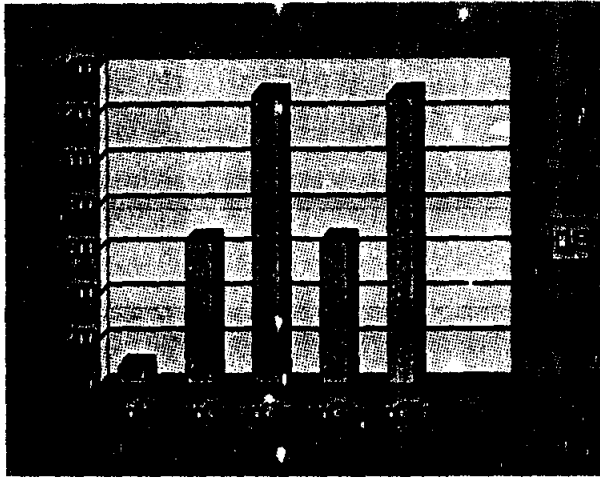
Gambar 3.17 Analisis respons imun humoral. Pada macaca fascicularis dan kelinci yang telah diimunisasi dan di booster.

Begitu juga respons antibodi seluler setelah dilakukan analisis dengan menggunakan imunositokimia menunjukkan bahwa reaktivitas limfosit terhadap anti interferon gama ditemukan sekitar 80% setelah dianalisis dibawah mikroskop imunofluoresen dengan pembesaran 40 X. Hasilnya seperti di bawah ini.



Gambar 3.18. Analisis reaktivitas sel imun terhadap interferon gama dengan A. flowcytometri dan B. imunositokimia, telah menunjukkan aktifitas sel imun yang aktif seperti pada panah. Hasil dari gambar diatas menunjukkan bahwa adjuvant dan partikel protein E rekombinan mempunyai antigenitas tinggi.

Adapun respons humoral pada hewan coba terhadap imunoglobulin tipe imunoglobulin seperti pada gambar di bawah.



Gambar 3.19. Hasil analisis imunoglobulin dengan *indirect*-ELISA telah menunjukkan bahwa IgG1 dan IgG2b telah mendominasi respons humoral yang bersifat protektif .

Profil antibodi humoral ini terjadi pada semua hewan coba yang telah diimunisasi dengan model vaksin klon subunit dengan menggunakan adjuvant monteneid-SEPPIC. Dosis yang diimunisasikan 0,5 ml secara intramuskuler. (im)

6. Karakteristik vVirus Dengue yang Terpilih sebagai Master seed

Berdasarkan hasil penelitian potensi protein E dari berbagai macam isolate virus dengue DEN-1 sampai dengan DEN-4 maka dapat ditentukan isolate yang terbaik untuk seed vaksin rekombinan.

6.1. Isolate Dengue (DEN-1)

- Virus DEN-1: Isolate virus dengue dari Lab. DHF. Institute of Tropical Disease
- Virus diisolasi dari serum pasien yang sedang sakit karena terinfeksi virus Dengue
- Pasase 20

6.2. Isolate Dengue (DEN-2)

- Virus DEN-2: Isolate virus dengue dari Lab. DHF. Institute of Tropical Disease
- Virus diisolasi dari serum pasien yang sedang sakit karena terinfeksi virus Dengue
- Pasase 17

6.2. Isolate Dengue (DEN-3)

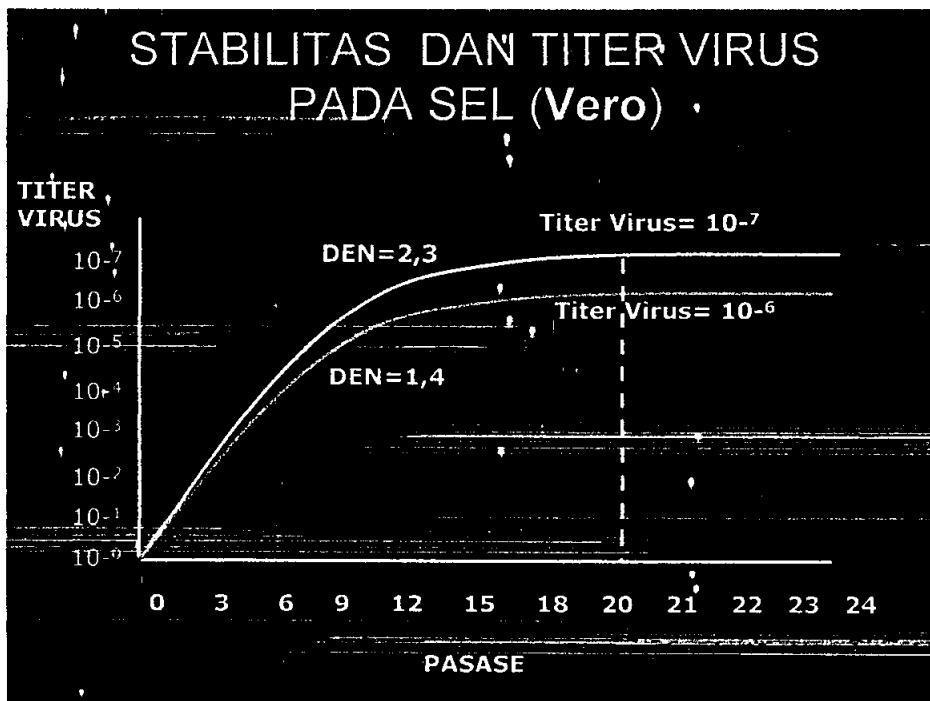
- Virus DEN-3: Isolate virus dengue dari Lab. DHF. Institute of Tropical Disease
- Virus diisolasi dari serum pasien yang sedang sakit karena terinfeksi virus Dengue
- Pasase 17

6.2. Isolate Dengue (DEN-4)

- Virus DEN-4: Isolate virus dengue dari Lab. DHF. Institute of Tropical Disease
- Virus diisolasi dari serum pasien yang sedang sakit karena terinfeksi virus Dengue
- Pasase 20

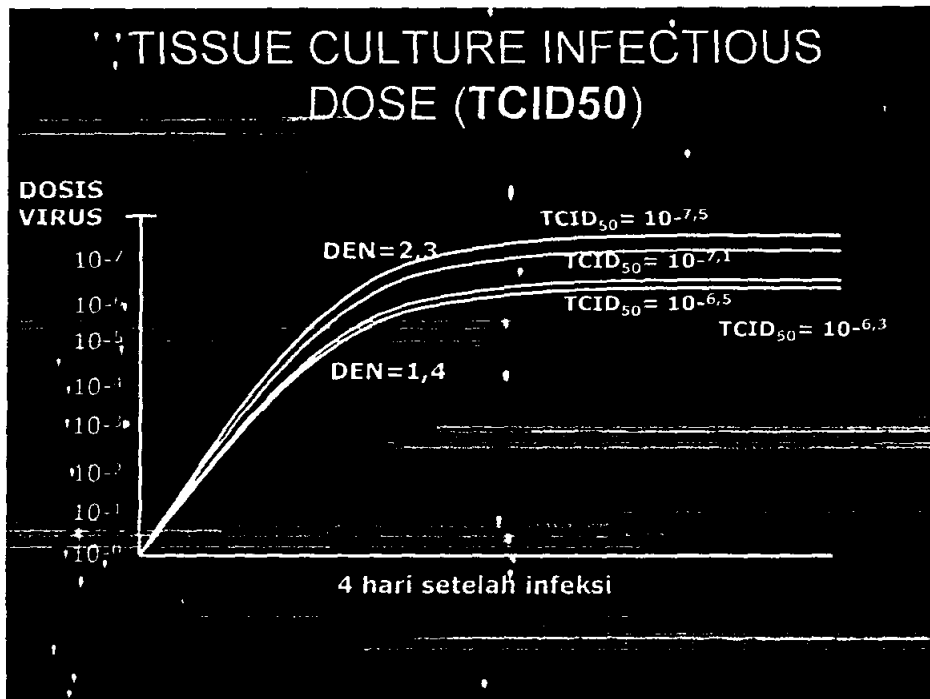
7. Stabilitas Virus Pada Kultur Sel Vero

Setelah dilakukan karakterisasi stabilitas virus berdasarkan virulensinya pada culture sel Vero maka dapat dilihat kinetic multiplikasi dari virus pada Gambar dibawah 3.1. dan 3.2 di bawah ini.



Gambar 3.1 Kine ketik dan stabilitas multiplikasi virus pada sel vero

Hasil dari multiplikasi virus dengue pada sel vero menunjukkan sifat yang berbeda diantara virus dengue. DEN-2 dan DEN-3 mempunyai kesamaan virulensi walaupun manifestasi efek pada sel relative sama. Hal ini ditunjukkan hasil titer virus pada keempat strain virus Dengue seperti Gambar 3.1. Begitu juga sifat virus berdasar pada TCID₅₀ pada Gambar 3.21. di bawah.



Gambar 3.21. Analisis TCID₅₀ virus Dengue pada kultur sel Vero.

Hasil diatas seperti pada Gambar 3.21. telah menunjukkan sifat keempat virus yang berbeda jika diinokulasikan pada sel, TCID₅₀ untuk DEN-2 relatif tinggi jika dibandingkan dengan strain virus dengue lainnya, sedang DEN-4 paling lemah. Hal ini sesuai dengan sifat replikasi dan multiplikasi yang dibangun melalui pembentukan sel single kemungkinan terjadi mRNA splicing sehingga tergantung juga pada lingkungan pada saat multiplikasi tetapi hal ini tidak begitu pengaruh pada masing-masing strain virus dengue karena terbukti dengan pasase yang berbeda untuk mendapatkan TCID yang dapat digunakan sebagai bahan vaksin.

8. Produk hasil Rekombinan

Setelah dilakukan harvest rekombinan dilakukan purifikasi dengan menggunakan Talon untuk analisis potensi calon vaksin melalui fiel trial dengan menggunakan volunteer, hal ini akan dilakukan oleh Pihak Biofarma Bandung.



Gambar 3.22. Suspensi protein rekombinan sebagai bahan vaksin klon subunit.

3.2. PEMBAHASAN

Virus dengue yang *genus flavivirus* sampai saat ini telah menginfeksi ratusan ribu orang dan menyebabkan kematian sekitar 60.juta orang di Dunia sampai saat ini masih belum dapat dicegah secara efisien dan efektif, dan sampai dekade saat ini virus dengue masih menjadi permasalahan besar dalam hal kesehatan masyarakat di Indonesia dan Negara-negara tropis di dunia

(Gibson, *et al*, 2002). Karena itu riset dalam penemuan model diagnosa, obat atau vaksin yang berkaitan dengan penyakit DHF sangat dipandang perlu. Pada penelitian ini telah dikumpulkan 282 sampel dari berbagai daerah provinsi di Indonesia walaupun sebagian besar sample berasal dari rumah sakit di Jawa Timur. Setelah dilakukan identifikasi serotype atau strain virus dengue sangat menakjubkan betapa cepat dan banyak sifat biologis yang ditemukan pada penelitian tahun pertama ini.

Pertama, virus dengue yang telah diidentifikasi selanjutnya dilakukan inokulasi pada kultur sel vero atau C6/36 didapatkan banyak pola virulensi yang muncul. Hal ini menandakan bahwa virus dengue telah berkembang dengan cepat dan mengakibatkan timbulnya variasi serotype yang cukup banyak pula. Hal ini ditemukan pada virus dengue serotype 2 dan serotype 3. Setelah dilakukan isolasi dan kemudian dilakukan analisis daya virulensinya ditemukan banyak hal seperti bentuk plaque (koloni CPE) pada sel sering ditemukan yang bervariasi, sering ditemukan plaque besar, kecil dan sedang. Hal ini tentunya dalam satu pasien kemungkinan terinfeksi virus dengue serotype sama tetapi varian berbeda. Sehingga kemungkinan manifestasi secara klinis pun berbeda hal ini terjadi seperti hasil penelitian (Larano *et al*, 1999. Rantam *et al*.1999).

Hasil identifikasi virus dengue dari berbagai daerah telah menunjukkan hasil yang cukup berbeda berdasarkan temuan jenis strain. Daerah dikepulauan Kalimantan banyak ditemukan virus dengue DEN-1 hal ini terkait dengan traveling dari masyarakat di kepulauan tersebut, begitu juga DEN-2 dan DEN-3 menunjukkan hasil bahwa sering terjadi overlapping antara Jakarta dan Surabaya, terlihat dari hasil DEN-2 banyak ditemukan di Surabaya dan DEN-3 banyak ditemukan di Jakarta. Virus Dengue DEN-4 banyak ditemukan dari daerah Jawa Tengah. Walaupun juga ditemukan dari daerah kepulauan di Sumatra. Sirkulasi strain dengue ini selain model traveling masyarakat juga kemungkinan jenis vektor yang membawahi virus Dengue. Karena itu diperlukan pendekatan eksplorasi virus dengue pada vektor dan jenis vektor berkaitan dengan densitas dan distribusi vektor secara menyeluruh di Indonesia. Sehingga ditemukan original virus dengue pada vektor.

Kedua, setelah dilakukan sekuensing kemudian dianalisis secara filogenetik menunjukkan bahwa virus dengue serotype mempunyai variant yang cukup banyak, karena itu sirkulasi virus dengue kemungkinan juga ditentukan oleh factor geografi, atau tempat bekerja, tempat bermain. Sebagai contoh hasil identifikasi virus dengue dengan multiplex/semi nested RT-PCR selanjutnya dilakukan analisis kekerabatan menunjukkan yidak hanya satu rumpun tetapi juga mungkiin sudah terjadi pergeseran clade, sehingga sifat virus yang ditemukan pada kultur sel berbeda bentuk dan besar koloni, hal ini menunjukkan bahwa terjadi pembentukan variant yang cukup signifikan. Karena itu strategi model pengobatan harus cepat ditemukan dan diformulasikan. Kejadian ini tidak hanya disebabkan oleh virus dengue serotype 2 saja tetapi juga serotype 3, namun untuk serotype 1 dan 4 masih lebih rendah tingkat virulensinya jika dianalisis dengan menggunakan model kultur sel.

Berdasarkan hasil identifikasi serotype dengan multiplex menunjukkan sangat signifikan perbedan virus yang menyerang pada anak dan virus dengue yang menyerang pada orang dewasa. Pada anak yang terinfeksi virus dengue ditemukan virus dengue yang termasuk serotype 2 dan serotype 3. Temuan ini kbarangkali mempunyai magna yang berarti bagi klinisi dalam penanganan kasus secara klinis, dan juga sangat berkaitan dengan status imun, adanya infeksi susulan atau memang infeksi bersamaan. Hal ini cukup menarik jika dikaitkan dengan filosofi model infeksi virus yang selalu ada factor interferensi, karena itu bagian ini juga akan dilakukan penelitian sehingga dapat terciptanya model vaksin yang dikenali oleg serua serotype dan variannya.

Keadaan di atas berbeda dengan kejadian DHF pada orang dewasa yang kebanyakan ditemukan virus dengue yang termasuk serotype 3. Serotipe 3 ternyata dalam penelitian ini mempunyai varian lebih banyak dibandingkan dengan serotype 2, hal ini ditunjukan setelah dilakukan analisis kekerabatan yang menunjukkan adanya tendensi munculnya varian yang cukup banyak. Jika dikaitkan dengan kasus di klinis yang sering terjadi manifestasi kilinis dengan berbagai grade maka serotype 3 patut diwaspadai, yang mungkin mudah menyebabkan dengue shock syndrome (DSS).

Setelah dilakukan identifikasi serotype, isolasi virus dan studi karakterisasi biologis virus dengue pada kultur sel vero, menunjukkan bahwa virus dengue serotype 2 dan 3 mempunyai sifat virulensi pada sel berbeda-beda, walaupun serotipenya sama. Virus yang virulensinya tinggi mempunyai titer virus sebesar $1/10000$ sedang yang rendah mempunyai titer $1/10$ atau $1/100$. Tentunya hal ini berkaitan dengan sifat virus dan daya infeksi pada sel tersebut terjadi enhancement atau tidak. Jika virus tersebut tidak terpengaruh maka virulensi virus akan semakin meningkat karena dapat mengaktifkan sitokin network atau komplemen yang dapat memperparah, akibatnya manifestasi klinis muncul dengan tajam, dan bervariasi.

Melalui analisis homologi sampai saat ini masih sulit untuk menentukan isolate mana yang layak untuk kandidat vaksin, karena sifat molekuler hampir sama, namun berdasarkan presentasi homologi akhirnya dijadikan patokan dalam penelitian ini, tentunya yang mempunyai nilai presentasi homologi yang tinggi terhadap satu sama lain maka dijadikan material vaksin. Protein E yang digunakan untuk rekombinan adalah virus dengue yang nilai homologinya cukup tinggi, dengan harapan dapat mengenali serotype dan varian virus dengue lainnya. Sehingga dapat digunakan selain vaksin juga diagnostik (WHO, 1997, Guzman et al. 2004).

Hasil identifikasi strain virus dengue yang digunakan sebagai bahan rekombinan dilakukan analisis virulensi, dimana strain DEN-2 dan DEN-3 jika tingkat virulensi virus yang tinggi, dan ditemukan paling tinggi tingkat virulensi virus 10^{-7} dan digunakan sebagai seed untuk vaksin, begitu juga strain DEN-1 dan DEN-4 menunjukkan hasil 10^{-6} . Variasi ini karena sifat virus untuk menginfeksi sel mempunyai kemampuan yang berbeda sehingga tingkat virulensinya juga berbeda, hal ini diikuti sampai pada pasase yang berbeda sampai menunjukkan hasil yang stabil setelah dilakukan titrasi virus menggunakan sel kultur dengan analisis focus forming unit (FFU). Sementara itu TCID₅₀ dari strain virus DEN-2 dan DEN-3 menunjukkan hasil yang berbeda DEN-2 menghasilkan $10^{7,5}$ dan DEN-3 menunjukkan $10^{7,2}$, sedang DEN-1 menghasilkan $10^{6,5}$ dan DEN-4 menunjukkan hasil $10^{6,3}$

Setelah dilakukan analisis molekuler dari seed virus yang terpilih selanjutnya digunakan sebagai bahan rekombinan dengan baculovirus sistem.

Berdasarkan hasil fusi dari gen protein E dengan menggunakan system baculovirus secara makroskopis menunjukkan adanya progresivitas yang cukup tinggi terlihat bentukan CPE dan sel yang sedang mengandung banyak virus telah dan belum mengalami lisis karena infeksi virus sangat nyata sekali.

Hasil protein yang telah diujikan pada hewan coba mempunyai potensi sebagai vaksin sangat signifikan sedang untuk pengujian pada manusia akan dilakukan oleh PT. Biofarma Bandung. Karena hasil ini menghasilkan kerjasama antara Unair dan PT Biofarma untuk formulasi vaksin klon subunit sehingga dapat diproduksi secara masal.

KESIMPULAN PENELITIAN

1. Telah ditemukan isolat virus dengue yang dapat dieksplorasi sebagai bahan vaksin klon subunit dengan cara rekombinan protein E dengan baculovirus dan selanjutnya diproduksi untuk bahan vaksin klon subunit.
2. Protein E rekombinan mempunyai sifat protektif dan field trial akan dilakukan oleh Biofarma Bandung.
3. Diperlukan establish model adjuvant yang dapat memodulasi respons imun sehingga dapat digunakan sebagai vaksin yang aman dan protektif.
4. Hasil rekombinan akan diujicobakan pada manusia oleh PT. Biofarma yang merupakan kerjasama dalam produksi vaksin klon subunit secara masal.

PUBLIKASI:

Hasil dari riset ini sebagian telah dipublikasikan melalui seminar nasional diberbagai tempat dan dipersiapkan untuk publikasi dalam jurnal internasional;

1. Development and design of subunit clone vaccine Indonesia Dengue virus Isolate., National Seminar of Bioscience – PERMI Surabaya and ITD-UA, Juni 2008

2. Development of Vaccine Clone Subunit of Dengue Virus Indonesia isolate. Pertemuan Ilmiah tahunan Perhimpunan Mikrobiologi Indonesia, Universitas Jenderal Soedirman, Purwokerto. Agustus 2008.
3. Dengue virus and Vaccine Development . Seminar Nasional Hasil Penelitian Hayati Universitas Brawijaya Malang, September 2008
4. Molecular diagnostic of dengue virus infection. National seminar Tropical Disease Update. ITD-Airlangga University, Surabaya. November 2008.
5. Vaccine development and new variant of dengue virus base on phylogenetic. Seminar Hasil Penelitian, Lembaga Penelitian dan Pengabdian Pada Masyarakat Universitas Jember, November 2008.
6. Biological characterization of new variant of dengue virus a cross indonesia (manuscripts, Archive Virology).
9. Molecular analysis dengue virus sevier DEN-2 and DEN-3 from patients dengue shock syndrome (Elsevier, transcript 2009)

REFERENSI

- [1] Guzman MG and Kouri G. Dengue diagnosis, advances and challenges. *Int J Infect Dis* 2004 Mar;8(2):69-80.
- [2] World Health Organization. Dengue haemorrhagic fever: diagnosis, treatment, prevention and control, 2nd ed. Geneva, Switzerland; 1997.
- [3] Gibbons RV, Vaughn DW. Dengue: an escalating problem. *BMJ* 2002 Jun 29;324(7353):1563-6.
- [4] Henchal EA, Polo SL, Vorndam V, Yaemsiri C, Innis BL, Hoke CH. Sensitivity and specificity of a universal primer set for the rapid diagnosis of dengue virus infections by polymerase chain reaction and nucleic acid hybridization. *Am J Trop Med Hyg* 1991 Oct;45(4):418-28.
- [5] Lanciotti RS, Calisher CH, Gubler D.J, Chang GJ, Vorndam AV. Rapid detection and typing of dengue viruses from clinical samples by using reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 1992 Mar;30(3):545-51.
- [6] Morita K, Tanaka M, Igarashi A. Rapid identification of dengue virus serotypes by using polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 1991 Oct;29(10):2107-10.
- [7] Oliveira De Paula S, Malta Lima D, Clotteau M, Pires Neto Rd Rda J, Lopes da Fonseca BA. Improved detection of dengue-1 virus from IgM-positive serum samples using C6/36 cell cultures in association with RT-PCR. *Intervirology* 2003;46(4):227-31.

- [8] Harris E, Roberts TG, Smith L, Selle J, Kramer LD, Valle S, Sandoval E, Balmaseda A. Typing of dengue viruses in clinical specimens and mosquitoes by single-tube multiplex reversetranscriptase PCR. *J Clin Microbiol* 1998 Sep;36(9):2634-9.
- [9] Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 1987 Apr;162(1):156-9.
- [10] Guzman MG, Kouri G. Dengue and dengue hemorrhagic fever in Americas: lessons and challenges. *J Clin Virol* 2003 May;27(1):1-13.
- [11] Rantam, FA pengembangan vaksin klon subunit DHF. Seminar nasional hasil penelitian hayati, 2008. Universitas Brawijaya.
- [12] Rantam, FA. Vaccine development of DHF base on patogenesis, PERMI 2008. Universitas Jenderal Soedirman.
- [13] Rantam, FA. Soegijanto, Yamanaka, A., Nasronudin, Agung, DW, Susilowati H., Hendrianto, E. Molecular diagnostic of Dengue Virus Infection. ITD. 2008
- [14] Rantam, F.A. 2003. Metode Immunologi, Airlangga University Press
- [15] Soegijanto S. multiple infection of Dengue virus, unpublsh 2008
- [16] Soedjoko, H., Soegijanto, Rantam, FA., Soetjipto. 2005. Epidemiologi molekuler virus dengue berdasarkan pada strain geografik di Indonesia. Diertasi. Universitas airlangga.
- [17] Leytmayer et al. 1999). Analysis of polypeptide dengue virus from different region in America and South East Asian. *J. Virol.*
- [18] Sambrook, J., Fritsch EF., Maniatis T. 1989. Molecular cloning laboratory manual. NewYork Cold Spring Harbor Pr.

ADMINISTRASI DAN KEUANGAN

REKAPITULASI BIAYA TAHUN 2009

| No. | Uraian | Tahun 2009 |
|---|-------------------|----------------------|
| 1. | Gaji dan Upah | 67.000.000,- |
| 2. | Bahan Habis Pakai | 93.515.500,- |
| 3. | Peralatan | 6.250.000,- |
| 4. | Perjalanan | 10.500.000,- |
| 5. | Lain-lain | 8.000.000,- |
| Jumlah: Biaya | | 185.265.000,- |
| Total biaya yang diusulkan | | 185.265.000,- |
| (seratus delapan pulu lima juta dua ratus enam pulu lima ribu rupiah) | | |

1. Gaji dan Upah

| N o. | Pelaksana | Jumlah Pelaksana | Jumlah jam/minggu | Honor/jam | Biaya | Realisasi |
|-------------------------|------------------|------------------|-------------------|------------|---------------------|-------------------|
| 1. | Peneliti Utama | 1 | 20 jam/mgg | 20.000/jam | 16.000.000 | 8.000.000 |
| 2 | Anggota Peneliti | 2 | 15 jam/mgg | 20.000/jam | 24.000.000 | 16.000.000 |
| 3. | Teknisi | 3 | 54 jam/mgg | 12.500/jam | 27.000.000 | 13.500.000 |
| J u m l a h Upah | | | | | 67.000.000,- | 37.500.000 |

2. Bahan habis Pakai:

| N o. | Nama bahan | Kegunaan | Biaya (Rp.) |
|------|----------------------------------|--------------------|--------------|
| 1 | Medium Kultur (DMEM) 4 pack | Isolasi virus | 2.000.000,- |
| 2 | FBS 2 ltr | Kultur sel | 20.000.000,- |
| 3 | Medium baculovirus 3 ltr | Penumbuh virus | 12.000.000,- |
| 4 | Flash 10 box | Produksi virus | 3.344.500,- |
| 5 | Mikroplate 96 well 10 box | ELISA | 1.500.000,- |
| 6 | Mikroplate 24 well 5 box | Kultur sel BHK21 | 697.200,- |
| 7 | Petridish 5, 10 cm 5 box | Kultur sel | 936.250,- |
| 8 | PBS | Cuci sel dan elisa | 220.000,- |
| 9 | EDTA 2x 100 ml | Isolasi plasma | 500.000,- |
| 10 | MgCl2 | Untuk PCR | 150.000,- |
| 11 | Agarose 500 gr | PCR | 1.500.000,- |
| 12 | Ethidium bromide 25 ml | Pewarna agarose | 360.000,- |
| 13 | Acrylamid 100 ml | SDS-PAGE | 1.200.000,- |
| 14 | Mineral free water (d H2O) 50 ml | PCR | 500.000,- |
| 15 | Plasmid 0,2 ml | Transfeksi | 3.000.000,- |
| 16 | Baculo virus 1 ml | Vektor | 2.100.000,- |
| 17 | Primer E | Sn-RT-PCR | 3.700.000,- |
| 18 | Enzim restriksi | kloning | 5.000.000,- |
| 19 | pNPP 1 vial | Imunoblotting/elis | 500.000,- |
| 20 | Membrane NC 1 pack | blotting | 500.000,- |
| 21 | PMSF 5 gr | protein inhibitor | 3.700.000,- |
| 22 | Protein K 10 gr | Memecah protein | 3.250.000,- |
| 23 | Konjugate IgG anti human 1 vial | Blotting/elisa | 2.400.000,- |
| 24 | Konjugate IgM anti human 1 vial | Blotting/elisa | 4.000.000,- |
| 25 | pNPP 1 vial | substrat | 2.250.000,- |
| 26 | Commasie blue R-250 5gr | pewarna gel | 200.000,- |
| 27 | Selofan 2 m | dialisis protein | 3.250.000,- |
| 28 | Protein Marker 2 vial | SDS-PAGE | 7.500.000,- |
| 29 | Bisacrylamide 250 gr | Karakterisasi prot | 1.500.000,- |
| 30 | APS | SDS-PAGE | 2.250.000,- |
| 31 | Glicine | Elektroforesis | 2.000.000,- |
| 32 | Eppendorf tubes 2 box | reagen | 900.000,- |

| | | | |
|----|------------------------------------|-----------------|----------------------|
| 33 | Tip (yellow, blue , white) 5 box | Elisa, PCR, SDS | 1.600.000,- |
| 34 | Adjuvant (montanied) animal 500 ml | imunisasi | 7.800.000,- |
| 35 | Thine tube 0,2 ml 3 box | amplifikasi | 2.000.000,- |
| 36 | Syringe 3 cc | koleksi darah | 2.000.000,- |
| 37 | Disposable gloves 17 box | untuk PCR, SDS | 535.000,- |
| 38 | Disposable tube 15 ml | Karakterisasi | 2.000.000,- |
| 39 | Penstrep tissue culture 4 x, 20 ml | Kultur sel | 1.600.000,- |
| 40 | Fungizone 10 ml | Kultur sel | 1.200.000,- |
| 41 | Al(OH)3 | Pemur. antigen | 3.135.000,- |
| 42 | Water for injection (WFI) | Vaccine mix | 800.000,- |
| | Total | Total | 117.035.000,- |

3. Komponen Peralatan

| No. | Alat | Biaya Sewa | Total perioda |
|-----|--------------------|--------------------|-------------------|
| 1. | Sequenser | 6.250.000 | 6.250.000 |
| 2. | Regulator | 3x 2,500..000/1 bh | 3.500.000 |
| 3 | Tank gas Co2 | 1 bh | 2.000.000 |
| 4 | Total biaya | | 11.750.000 |

4. Perjalanan

| No. | Kota Tujuan | Volume | Satuan biaya (Rp.) | Jumlah Biaya (Rp.) |
|-----|--------------------|--------|--------------------|---------------------|
| 1. | Medan | 1 | 1.000.000 | 2000.000 |
| 2. | Balik papan | 1 | 600.000 | 1200.000 |
| 3 | Pontianak | 1 | 1.000.000 | 2000.000 |
| 4 | Makasar | 1 | 500.000 | 1000.000 |
| 5 | Jakarta | 1 | 500.000 | 1000.000 |
| 6 | Bandung | 1 | 500.000 | 1000.000 |
| 7 | Bali | 1 | 500.000 | 1000.000 |
| 8 | NTB | 1 | 650.000 | 1.300.000 |
| | Total Biaya | | | 10.500.000 |

5. Lain-lain (Administrasi , publikasi dan operasional)

| No. | Jenis Keperluan | Volume | Satuan Biaya (RP.) | Jumlah biaya (Rp) |
|-----|--|---------|---------------------|--------------------|
| 1 | Administrasi: fotocopy, literatur, internet, studi literatur | 1 paket | 2.500.000,- | 2.500.000,- |
| 2 | Publikasi: Pengadaan laporan, penerbitan artikel | 1 paket | 2.500.000,- | 2.500.000,- |
| 3 | Operasional analisa data dan diskusi/seminar lokal | 1 paket | 2.823.000,- | 2.823.000,- |
| | Jumlah biaya lain-lain | | | 7.823.000,- |

BAB IV

Penutup

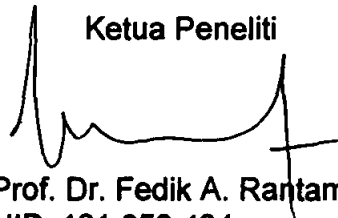
Dana operasional yang diturunkan pada tahun 1 dan tahun ke 2 sangat membantu berjalannya penelitian ini untuk eksplorasi dan menentukan model vaksin. Karena itu laporan akhir ini merupakan hasil akhir penelitian yang dilaksanakan selama 2 tahun. Hasil yang dicapai sangat menggembirakan karena hasil penelitian ini dilanjutkan dengan PT. Biofarma Bandung untuk field trial dan selanjutnya diproduksi untuk vaksin dengan model yang akan dimodifikasi terutama model adjuvant. Mudah-mudahan tahun 2010 dapat dilakukan field trial pada manusia dan merupakan vaksin yang mempunyai protektifitas tinggi yang mempunyai safety tinggi.

Mengetahui

Kepala LPPM Unair

Prof. Dr. Bambang Sektiari, L., DEA
NIP. 131 837 004

Ketua Peneliti



Prof. Dr. Fedik A. Rantam
NIP. 131.653.434

