

SELESAI

DEC 2003



PAMERAN

LAPORAN PENELITIAN
ILMU PENGETAHUAN DASAR
TAHUN ANGGARAN 1999/2000

**ISOLASI DAN KARAKTERISASI PROTEIN E VIRUS DENGUE
ISOLAT SURABAYA SEBAGAI BAHAN DIAGNOSTIK**

MILIK
PERPUSTAKAAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA

Peneliti :

**SUWARNO
FEDIK ABDUL RANTAM
YOES PRIJATNA DACHLAN**

LEMBAGA PENELITIAN UNIVERSITAS AIRLANGGA

Dibiayai oleh : Proyek Pengkajian dan Penelitian Ilmu Pengetahuan Dasar
DIP Nomor : 015 /XXIII/4/--/1999 Tanggal 1 April 1999
Kontrak Nomor : 019/P2IPD/DPPM/VI/19991999
Ditbinlitabmas, Ditjen Dikti, Depdikbud
Nomor Urut : 2

**TROPICAL DISEASE CENTRE
UNIVERSITAS AIRLANGGA**

Januari, 2000

IDENTITAS DAN PENGESAHAN
LAPORAN AKHIR HASIL PENELITIAN DASAR

1. a. Judul Penelitian : Isolasi dan Karakterisasi Protein E Virus Dengue Isolat Surabaya sebagai Bahan Diagnostik
- b. Kategori Penelitian : I / II / III
2. Kepala Proyek Penelitian
- a. Nama Lengkap dengan Gelar : Suwar no, MSi., drh.
- b. Jenis Kelamin : L/P
- c. Pangkat/Golongan dan NIP : Penata / IIIc / 131 836 994
- d. Jabatan Fungsional : Lektor Muda
- e. Fakultas / Jurusan / Puslit : Tropical Disease Center
- f. Univ. / Inst. / Akademi : Universitas Airlangga
- g. Bidang Ilmu yang Diteliti : Imunologi
3. Jumlah Tim Peneliti : 3 (tiga) orang
4. Lokasi Penelitian : Tropical Disease Center
5. Jangka Waktu Penelitian Tahap I : 5 (lima) bulan
6. Biaya yang Diperlukan : Rp13.000.000,00 (Tigabelas juta rupiah)

Mengetahui
Ketua Tropical Disease Center
Universitas Airlangga,

Surabaya, 22 Desember 1999
Ketua Peneliti,



Ms. Priyatna
Prof. Dr. dr. H. Yoes Priyatna Dachlan, MSc.
NIP. 130 359 278

-s- Suwarno
drh. Suwarno, MSi.
NIP. 131 836 994



Mengetahui,
Ketua Lembaga Penelitian Universitas Airlangga

Noor Cholies Zaini
Prof. Dr. Noor Cholies Zaini
NIP. 130 355 372

RINGKASAN

ISOLASI DAN KARAKTERISASI PROTEIN E VIRUS DENGUE ISOLAT SURABAYA SEBAGAI BAHAN DIAGNOSTIK (Suwarno, Fedik A. Rantam dan Yoes Prijatna Dachlan, 23 halaman).

Beberapa uji serologik terhadap infeksi virus Dengue mempunyai sensitifitas yang relatif rendah. Hal ini disebabkan ketidakspezifikan antigen yang digunakan, sehingga menghasilkan nilai diagnosis yang kurang tepat.

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui karakter dan mendapatkan protein E dari virus Dengue isolat Surabaya sebagai bahan diagnostik.

Penelitian ini terdiri dari beberapa tahap, yakni analisis , karakterisasi dan isolasi protein E. Analisis protein untuk mengetahui berat molekul protein E dilakukan dengan teknik SDS-PAGE, sedangkan karakterisasi protein dilakukan dengan teknik Western Blot menggunakan antibodi poliklonal kelinci anti-Den-3. Protein E dari gel elektroforesis kemudian diisolasi dan hasilnya diuji kembali dengan SDS-PAGE.

Hasil penelitian menunjukkan, protein E virus Dengue isolat Surabaya memiliki berat molekul sekitar 52 kDa dan merupakan protein antigenik yang dapat bereaksi spesifik terhadap antibodi poliklonal kelinci anti-Den-3.

Berdasarkan hasil penelitian ini dapat disimpulkan bahwa dengan teknik SDS-PAGE dapat diketahui berat molekul dari protein E Virus Dengue isolat Surabaya. Pada Western Blot dapat dikarakterisasi bahwa protein E adalah protein antigenik.

(Lembaga Penelitian, Tropical Disease Center, Universitas Airlangga. Kontrak Nomer : 19/P2IPD/DPPM/VI/99).

SUMMARY

ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF E PROTEIN OF DENGUE VIRUS SURABAYA ISOLATE FOR DIAGNOSTIC MATERIALS (Suwarno, Fedik A. Rantam dan Yoes Prijatna Dachlan, 23 pages)

The sensitivity of several of serologic tests to Dengue virus infections was respectively low. Due to the non specificity of antigen resulting incorrect diagnosis.

The aims of this research is to isolate and characterize E protein of Dengue virus Surabaya isolate therefore can be used as diagnostic material.

This research is divided in to three periods: isolation, characterization and analysis of E protein was performed by SDS-PAGE techque, while characterization of this protein was performed by Western Blot technique using rabbit anti Den-3 polyclinal antibody. E protein from gel electrophoresis was then isolated rechecked by SDS-PAGE.

The result showed that molecular weight of E protein of Dengue virus Surabaya isolate was 52 kDa and it was antigenic protein which reacted specifically to rabbit anti Den-3 polyclonal antibody.

Based on this result can be concluded that by SDS-PAGE technique E protein virus Dengue Surabaya isolate was antigenic protein with molecular weight 52 kDa.

(Research Institution, Faculty of Veterinary Medicine Airlangga University, Number of contract: No.19/P21PD/DPPN/VI/1999).

KATA PENGANTAR

Teknik elektroforesis dengan menggunakan SDS-PAGE saat ini banyak digunakan untuk memisahkan protein dari suatu bahan, di mana karakter dari suatu protein dapat diketahui berdasarkan berat molekulnya. Dari berbagai protein yang sudah berhasil dipreparasi, kemudian dapat diisolasi protein yang diinginkan untuk selanjutnya dikarakterisasi dengan menggunakan antibodi spesifik. Proses karakterisasi protein dengan *immunoblotting (Western Blot)* sangat bermanfaat untuk mengevaluasi reaksi antigen antibodi yang tidak dapat dilaksanakan pada media gel.

Penelitian ini dilakukan untuk isolasi dan karakterisasi protein E (*envelope*) dari virus Dengue isolat Surabaya dalam upaya pembuatan bahan diagnostik untuk *Dengue Haemorrhagic Fever (DHF)*. Dengan teknik SDS-PAGE yang dilanjutkan dengan *Western Blot*, akhirnya dapat diketahui karakter dari protein E tersebut.

Penulis mengucapkan banyak terima kasih kepada Pimpinan Proyek Pengkajian dan Penelitian Ilmu Pengetahuan Terapan/DP3M Ditjen Dikti Depdikbud, Rektor Universitas Airlangga, Ketua Lembaga Penelitian Unair, Ketua Tropical Disease Center Unair dan semua pihak yang secara langsung ataupun tidak langsung turut membantu dalam kegiatan penelitian ini dari awal hingga terselesainya laporan ini.

Akhirnya semoga penelitian ini dapat bermanfaat bagi yang membutuhkan informasi yang berkaitan dengan teknik isolasi dan karakterisasi protein E dari virus Dengue. Tentu penulisan ini masih banyak kekurangannya, untuk itu Penulis mengharap kritik dan saran demi kesempurnaannya.

Surabaya, Desember 1999

Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
RINGKASAN.....	ii
SUMMARY	iii
KATA PENGANTAR	iv
DAFTAR ISI	v
DAFTAR GAMBAR.....	vii
BAB 1 PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang Penelitian	1
1.2 Rumusan Masalah	3
BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA	4
2.1 Dengue Haemorrhagic Fever	4
2.2 Virus Dengue	4
2.3 Vektor.....	5
2.4 Patogenesis.....	5
2.5 Diagnosis.....	8
BAB 3 TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN	9
3.1 Tujuan Penelitian	9
3.2 Manfaat Penelitian	9
BAB 4 METODE PENELITIAN	10
4.1 Waktu dan Tempat Penelitian	10
4.2 Unit Analisis.....	10
4.3 Virus dan Sel	10
4.4 Pertumbuhan Virus dan Sel Lysat.....	11
4.5 Pembuatan Antibodi Poliklonal.....	11
4.6 Analisis Protein dengan SDS-PAGE	11

4.7 Karakterisasi protein dengan Wester Blot	12
4.8 Isolasi Protein E	13
BAB 5 HASIL DAN PEMBAHASAN	14
5.1 Hasil Penelitian	14
5.2 Pembahasan	17
BAB 6 KESIMPULAN DAN SARAN	20
6.1 Kesimpulan	20
6.2 Saran	20
DAFTAR PUSTAKA	21

DAFTAR GAMBAR

Gambar		Halaman
2.1	Mekanisme patogenesis Virus Dengue	7
5.1	Hasil preparasi protein struktural Virus Dengue-3 isolat Surabaya dengan teknik SDS-PAGE	15
5.2	Hasil karakterisasi protein struktural Virus Dengue-3 isolat Surabaya dengan teknik Western Blot.....	16
5.3	Hasil isolasi protein-E Virus Dengue-3 isolat Surabaya yang dicek kembali dengan teknik SDS-PAGE.....	17

BAB I PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang Penelitian

Infeksi virus *Dengue* masih merupakan suatu masalah penting di daerah tropis, khususnya Indonesia. Di beberapa daerah tropis dan subtropis penyakit ini bersifat endemis atau epidemis. Penyakit ini pada awalnya banyak menyerang anak-anak di daerah *urban* (perkotaan), tetapi belakangan ini ada kecenderungan menyerang orang dewasa dan menyebar ke daerah *rural* (pedesaan).

Infeksi oleh virus *Dengue* dapat mengakibatkan manifestasi klinis yang sangat beragam, mulai yang bersifat asimtomatik, *Undifferentiated Fever*, *Dengue Fever* (DF), *Dengue Haemorrhagic Fever* (DHF) dan dapat berlanjut menjadi *Dengue Shock Syndrome* (DSS). Penegakan diagnosis berdasarkan kriteria WHO agak sulit diterapkan, karena beragamnya gejala klinik dan dari hasil pemeriksaan laboratorium seringkali luput dari pengawasan (Soegijanto, 1998).

Kriteria tersebut seyogyanya harus ditunjang dengan pemeriksaan serologik. Saat ini beberapa uji serologik mempunyai sensitifitas yang rendah. Salah satu sebabnya adalah ketidakspesifikan antigen yang digunakan di dalam mendeteksi antibodi. Penggunaan virus utuh untuk mendeteksi antibodi tidaklah spesifik, karena antibodi yang terbentuk sangat beragam dan mempunyai spesifikasi yang berbeda-beda terhadap komponen virus.

Virus Dengue yang termasuk genus *Flavivirus* dan famili *Flaviviridae* dapat dibedakan menjadi empat serotipe, yakni Den-1, Den-2, Den-3 dan Den-4. Virus Dengue memiliki tiga jenis protein struktural, yakni envelope (E), premembran (prM) dan core (C), serta tujuh protein non-struktural (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B dan NS5). Di antara protein struktural, protein E merupakan protein terpenting di dalam menimbulkan respons imun. Protein E yang terletak pada amplop virus, memiliki fungsi biologik penting, antara lain sebagai pengikat reseptor, fusi membran dan hemaglutinin. Protein E juga merupakan protein imunogenik yang mampu memicu pembentukan antibodi spesifik (Sittisombut, 1994; Tung *et al.*, 1995).

Ketika terjadi infeksi sel, protein E terikat secara langsung pada permukaan membran fagosit mononuklear melalui protein yang belum terkarakterisasi. Proses fusi dapat berlangsung antara virion dengan liposom membran atau membran plasma atas prakarsa protein E melalui *reseptor mediated endocytosis* (RME). Setelah proses fusi berlangsung, terjadilah pelepasan selubung nukleokapsid (*uncoating* dan translasi genom dari RNA) (Rantam, 1998).

Selama terjadi proses fusi, tubuh dapat membentuk respon imun dengan pembentukan antibodi netralisasi terhadap protein E, baik pada mencit maupun manusia. Pada hari keempat pasca imunisasi dengan protein E, antibodi yang terbentuk dapat melindungi mencit dari *lethal challenge* dengan virus Dengue-2 (Konishi *et al.*, 1999).

Dengan melakukan isolasi dan analisis terhadap protein E yang mempunyai kemampuan antigenik tinggi, terutama ikatannya terhadap antibodi pada penderita dengan infeksi dini, merupakan dasar dari penelitian ini. Mengingat adanya empat serotipe yang berbeda, di mana struktur antigenik protein E pada keempat serotipe memiliki tingkat homologi yang tinggi, maka dengan isolasi dan karakterisasi protein E akan didapatkan bahan dasar sebagai komponen diagnostik yang dapat mengenali antibodi penderita dari semua serotipe. Dengan demikian protein E dapat digunakan sebagai komponen diagnostik, khususnya terhadap aplikasi dengan uji ELISA, baik untuk deteksi antibodi pada infeksi primer maupun sekunder.

2.2 Rumusan Masalah

- 1) Apakah protein E virus Dengue isolat Surabaya dapat diketahui berat molekulnya dengan teknik SDS-PAGE (*sodium dodecyl sulphate-polyacrylamid gel electrophoresis*)?
- 2) Apakah protein E virus Dengue isolat Surabaya merupakan protein antigenik jika direaksikan dengan antibodi spesifik pada *Western Blot*?

BAB II TINJAUAN PUSTAKA

2.1 *Dengue Haemorrhagic Fever*

Di Indonesia DF/DHF pertama kali dilaporkan pada tahun 1968 (Surabaya dan Jakarta) dengan *case fatality rate* (CFR) 41,5%. Pada tahun 1997 DF/DHF telah menyerang semua propinsi (27 propinsi) di Indonesia. Selama 5 tahun terakhir (1994-1998) kasus kejadian DHF cenderung meningkat, meskipun angka CFR berhasil diturunkan dari 2,5% pada tahun 1994 menjadi 2% pada tahun 1998 (Kuntarjanto, 1998; Suroso, 1999).

Akibat penting infeksi virus Dengue akan menimbulkan dua macam penyakit, yaitu DF atau DHF. Kedua bentuk penyakit ini dibedakan dengan adanya peningkatan permeabilitas dinding pembuluh darah yang mengakibatkan kebocoran plasma ke kompartemen ekstravaskuler. Akibatnya akan terjadi penurunan volume plasma intravaskuler dan menurunnya tekanan darah (hipotensi). Apabila terjadi kebocoran yang hebat dapat terjadi *shock hipovolemik* (DSS), yang apabila tidak segera diatasi dapat mengakibatkan anoksia jaringan, asidosis metabolik dan kematian (Soegijanto, 1998).

2.2 *Virus Dengue*

Virus Dengue terdiri dari empat serotipe yang secara antigenik berbeda. Infeksi dengan salah satu serotipe hanya akan memberi kekebalan seumur hidup untuk serotipe tersebut, tetapi tidak memberikan kekebalan silang (*cross-protective immunity*) total untuk serotipe lainnya (hanya

memberikan kekebalan partial yang bersifat sementara), sehingga di daerah endemis Dengue, seseorang dapat terinfeksi dengan keempat serotipe tersebut. Tiap-tiap serotipe dapat terdiri dari beberapa strain yang berbeda-beda sifatnya. Infeksi pertama kali (*primary infection*) dengan salah satu serotipe akan menimbulkan sindroma *Dengue Fever*, sedangkan infeksi kedua (*secondary infection*) dengan serotipe yang lainnya (*heterotypic serotype*) akan menimbulkan sindroma DHF atau DSS (Soewondo, 1998).

Semua serotipe Virus Dengue dapat ditemukan di Indonesia. Virus Dengue-3 paling sering menimbulkan wabah di beberapa daerah, diikuti Dengue-2, Dengue-1 dan Dengue-4. Virus Dengue-3 juga merupakan serotipe yang paling bertanggung jawab terhadap beberapa kasus DHF diikuti oleh Dengue-2 (Suroso, 1999).

2.3 Vektor

Menurut Suroso (1990) sebagai vektor DHF adalah nyamuk *Aedes*, terutama *A. aegypti*. Nyamuk ini hidup di dalam dan di sekitar rumah dan mempunyai kebiasaan menggigit pada siang hari. Vektor lain adalah *A. albopictus* dan *A. scutellaris*. Virus Dengue yang terhisap nyamuk akan mengadakan replikasi di dalam tubuh nyamuk selama 7-14 hari (*extrinsic incubation period*) sebelum dapat ditularkan kepada manusia.

2.4 Patogenesis

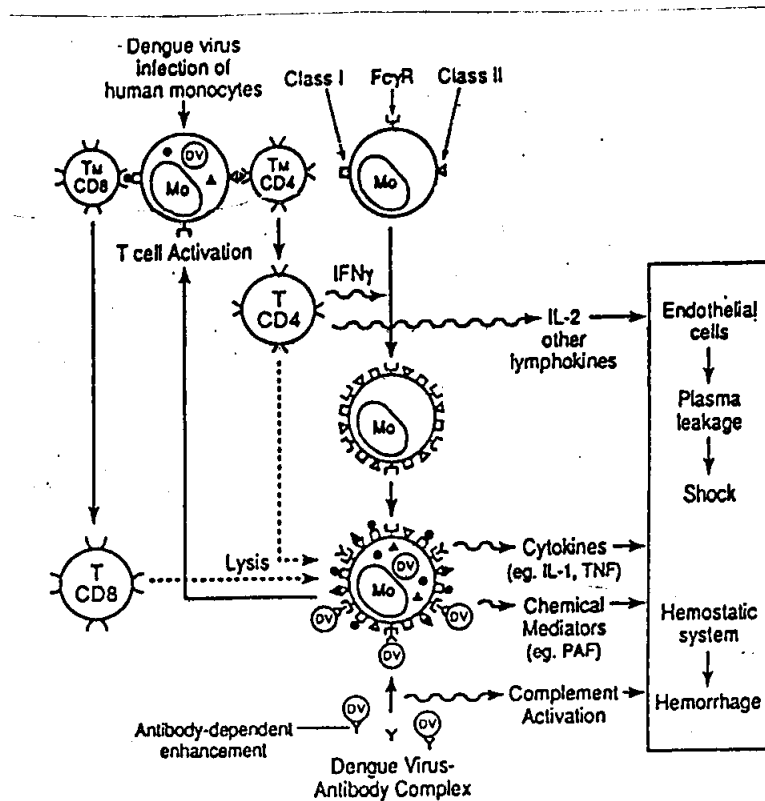
Patogenesis DHF/DSS merupakan proses imunopatologik. Ada empat teori mengenai DHF/DSS yaitu, the *secondary heterologous infection*, the

virus virulence, the virus-antibody complex dan *the immune enhancement* (Soewondo, 1998).

Menurut teori pertama, kejadian DHF akan muncul apabila seseorang telah terinfeksi virus Dengue untuk pertama kali, kemudian mendapatkan infeksi kedua dengan serotipe lain dalam waktu 6 bulan sampai 5 tahun. Berbeda dengan teori pertama, maka teori kedua menyatakan bahwa kasus DHF dapat timbul apabila seseorang terinfeksi pertama kali dengan strain serotipe yang paling ganas. Teori ketiga menerangkan adanya reaksi kompleks antigen-antibodi. Adanya *virus-antibody complex* yang terbentuk akan mengaktifkan komplemen, yang kemudian akan mengeluarkan bahan mediator C3a dan C5a anafilatoksin yang mempunyai efek farmakologis cepat dan pendek. Bahan ini bersifat vasoaktif dan prokoagulan, sehingga menimbulkan kebocoran plasma dan perdarahan. Teori keempat merupakan kelanjutan dari teori ketiga, di mana adanya *virus-antibody complex* akan menancap pada Fc reseptor pada permukaan monosit/makrofag yang merupakan target dari Virus Dengue. Akibat proses ini, maka monosit/makrofag akan melepaskan bahan mediator (monokin) yang memiliki sifat vasoaktif atau prokoagulan, sehingga akan mengakibatkan kebocoran plasma dan perdarahan (Soewondo, 1998; Soegijanto, 1998).

Menurut Kurane *et al.* (1994) timbulnya DHF/DSS justru dipicu oleh sel T sitotoksik CD4+ dan CD8+. Adanya virus Dengue yang menginfeksi monosit akan merangsang sel T sitotoksik untuk menghasilkan interferon gamma (IFN γ), interleukin-dua (IL-2) dan limfokin lainnya. Interferon gamma akan meningkatkan *antibody dependent enhancement* (ADE) melalui

reseptor Fc pada monosit, sekaligus memunculkan molekul MHC I dan II. Akibatnya monosit akan dilisis oleh sel T sitotoksik CD4⁺ dan CD8⁺ dan dilepaskan berbagai monokin. Pada kasus DHF/DSS dapat ditunjukkan bahwa *level soluble IL-2 receptor (sIL-2R)* dan *soluble CD4 (sCD4)* dalam darah lebih tinggi daripada kasus DF, sedangkan sCD8 hanya ditemukan pada penderita DHF/DSS (Gambar 2.1).



Gambar 2.1 Mekanisme patogenesis Virus Dengue.
Sumber: Kurane *et al.* (1994).

2.5 Diagnosis

Diagnosis terhadap DHF menurut kriteria WHO dapat ditentukan berdasarkan gejala klinik dan pemeriksaan laboratorium. Penegakan diagnosis dapat dilakukan dengan uji serologik ataupun pemeriksaan virologik. Uji serologik yang sering dilakukan antara lain adalah, uji hambatan hemaglutinasi, uji netralisasi, uji fiksasi komplemen, uji hemadsorpsi imunosorben, uji RIA, uji ELISA anti Dengue Ig M, uji Dengue Blot. Untuk deteksi antigen, saat ini banyak digunakan teknik PCR (*Polymerase Chain Reaction*) dan hibridisasi asam inti (Sankawibha, 1994; Maneekarn, 1994).

BAB III TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN

3.1 Tujuan Penelitian

3.1.1 Tujuan umum

Penelitian ini secara umum bertujuan mengkarakterisasi protein E sebagai koponen bioaktif yang dapat dibakukan guna pembuatan kit diagnostik, utamanya kespesifikannya di dalam mengikat antibodi penderita.

3.1.2 Tujuan khusus

- 1) Mengetahui berat molekul protein E virus Dengue isolat Surabaya dengan teknik SDS-PAGE.
- 2) Mengetahui antigenitas protein E dari virus Dengue isolat Surabaya jika direaksikan dengan anbodi spesifik pada *Western Blot*..

3.2 Manfaat Penelitian

Penelitian ini diharapkan dapat melengkapi temuan ilmiah dalam pengembangan sarana diagnosis dengan menggunakan protein E sebagai antigen. Protein E ini nantinya dapat dimanfaatkan untuk mendeteksi antibodi penderita pada infeksi dini, baik pada infeksi primer maupun sekunder dari kasus DF/DHF/DSS.

BAB IV METODE PENELITIAN

4.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini berlangsung selama 5 bulan, dari bulan Juli sampai dengan Desember 1999, bertempat di Lab. Dengue Tropical Disease Center, Universitas Airlangga.

4.2 Unit Analisis

Unit analisis dalam penelitian ini adalah virus Dengue serotipe-3 hasil isolat Laboratorium Dengue TDC Unair, yang berasal dari penderita di RSUD Dr. Soetomo Surabaya. Virus ini telah ditumbuhkan pada sel monolayer *baby hamster kidney* (BHK). Sel BHK yang telah diinfeksi virus Dengue dalam selang waktu tertentu kemudian dilisiskan untuk karakterisasi protein virus.

4.3 Virus dan Sel

Virus Dengue strain Den-3 yang digunakan dalam penelitian ini merupakan koleksi dari Lab. Virus Dengue, Tropical Disease Center Unair, yang telah diadaptasikan pada sel monolayer *baby hamster kidney* (BHK). Sel BHK dibiakkan pada medium MEM dengan 10% fetal calf serum (FCS) dan 2% asam amino nonesensial, serta sel dapat diinfeksi virus bila pertumbuhannya telah mencapai lebih dari 80%. Strain Den-3 virus Dengue ditentukan dengan uji *indirect immunofluorescent* dengan antibodi spesifik.

4.4 Pertumbuhan Virus dan Sel Lysat

Virus Den-3 ditumbuhkan pada sel BHK selama 72 jam untuk bahan analisis protein virus. Sel BHK yang telah diinfeksi kemudian dipanen dan ditambahkan 0,5% NP 40 untuk membuat sel *lysat*.

4.5 Pembuatan Antibodi Poliklonal

Antibodi poliklonal diproduksi pada hewan coba kelinci, dengan cara menyuntikkan virus Dengue strain Den-3 sebanyak 3 kali dengan interval waktu 2 minggu (Kuno, 1991).

4.6 Analisis Protein dengan SDS-PAGE

Analisis protein terhadap virus Den-3 dilakukan dengan teknik *sodium dodecyl sulphate polyacrilamide gel electrophoresis* (SDS-PAGE) dengan komposisi *separating gel* 12% (2,5 ml acrylamide; 1,2 ml Tris-HCl pH 8,8; 1,2 ml SDS 0,5%; 1,1 ml aquadest, 50 µl Temed dan 30 µl APS 10%) dan *stacking gel* 12% (0,66 ml acrylamide; 0,8 ml Tris-HCl pH 6,8; 0,8 ml SDS 0,5%; 0,74 ml aquadest; 4 µl Temed dan 20 µl APS 10%). Plate berisi gel kemudian dipasang pada Minigel Twin G-42 slab dan dituangkan *electrophoresis buffer* (30,29 g Tris aminomethan; 144,13 g glisin; 10 g SDS dalam 1000 ml aquadest).

Sebanyak 15 µl sampel berupa sel *lysat* yang telah didenaturasi dengan *Lamlli buffer* (Tris-HCl pH 6,8 1,0 ml, gliserin 0,8 ml, SDS 10% 1,6 ml, bromfenolblue 0,5% 0,4 ml, merkptoetanol 5% 50 µl, aquades 3,8 ml) pada pemanasan 100°C selama 5 menit, dimasukkan pada sumuran

stacking gel. Sebagai marker digunakan protein dengan berat molekul pada kisaran 14,5-200 kDa produksi BIO-RAD. Elektrophoresis dinyalakan dengan tegangan 40 V dengan kuat arus 10 mA dan ditingkatkan menjadi 120 V 25 mA ketika sampel telah melewati *stacking gel*; kira-kira selama 1 jam.

Pencucian terhadap gel hasil *running* dilakukan 3 tahap, masing-masing menggunakan metanol 50% dan asam asetat 7,5% selama 30 menit, metanol 5% dan asam asetat 7,5% selama 20 menit, dan glutaraldehida 10% selama 25 menit. Gel kemudian dicat dengan pewarnaan silver (1,6 g AgNO₃ dalam 8 ml aquadest; 42 ml NaOH 0,36%; 2,8 ml NH₃ 25% dalam 147 ml aquadest) selama 15 menit, dilanjutkan pencucian 2 kali 2 menit dengan aquadest dan kemudian ditambahkan larutan pengembang warna (200 µl asam sitrat 5%; 100 µl formaldehid 37% dalam aquadest 200ml) dan dilakukan pencucian kembali selama 2 kali 2 menit. Setelah gel terwarnai kemudian dimasukkan dalam larutan asam asetat 10% untuk menghentikan proses pengecatan. Selanjutnya gel dapat disimpan pada larutan gliserin 10% (Harlow dan Lane, 1988).

4.7 Karakterisasi Protein dengan Western Blot

Protein dari SDS-PAGE dikarakterisasi dengan teknik *Western Blot*. Setelah proses *running* selesai, gel ditransfer pada membran nitroselulose dengan cara *semi-dry electrophoresis*. Pada *anode electroblotting transfer apparatus* berturut-turut dimasukkan 5 lembar kertas absorben, 1 lembar nitroselulose, gel, 5 lembar kertas absorben, kemudian dituangkan *transfer*

buffer (15,15 g Tris aminomethan; 72 g glisin; 1000 ml metanol dalam 5000 ml aquadest pH 8,3), kemudian dinyalakan dengan tegangan 5 V dan kuat arus 45 mA selama 60 menit.

Membran nitroselulose (*blot*) kemudian di-*blocking* dengan 1% *bovine serum albumin* (BSA) selama 20 menit dan dicuci 2 kali 5 menit dengan PBS-tween, selanjutnya ditambahkan antibodi poliklonal *rabbit-anti Den-3* sebanyak 1 : 500 selama 3 jam. *Blot* kemudian dicuci 4 kali 5 menit dan berikutnya ditambahkan konjugat *goat anti-rabbit* yang berlabel enzim alkalin fosfatase dengan perbandingan 1 : 10.000 selama 1 jam. Setelah berlalu *blot* dicuci 3 kali 5 menit dan dilakukan pewarnaan dengan *fast-red* (200 mM Tris-HCl pH 8,0; 2 mM MgCl₂; 12 mg/ml *fast-red*; 0,8 mg/ml p-NPP dalam 500 ml aquadest). *Blot* dicuci lagi dengan PBS selama 5 menit dan dikeringkan (Harlow dan Lane, 1988).

Pada *Western Blot* ini digunakan marker berupa protein standar dengan berat molekul antara 14,2–86,0 kDa produksi BIO-RAD.

4.8 Isolasi Protein E

Gel dari SDS-PAGE tanpa pewarnaan dipotong sepanjang pita pada protein E, kemudian dilakukan dialisis dalam kantong nilon yang diletakkan dalam elektrophoresis. Kantong nilon kemudian dituangi *electrophoresis buffer* dan diberi tegangan 150 V dengan kuat arus 30 mA, selama 2 jam (Harlow dan Lane, 1988).

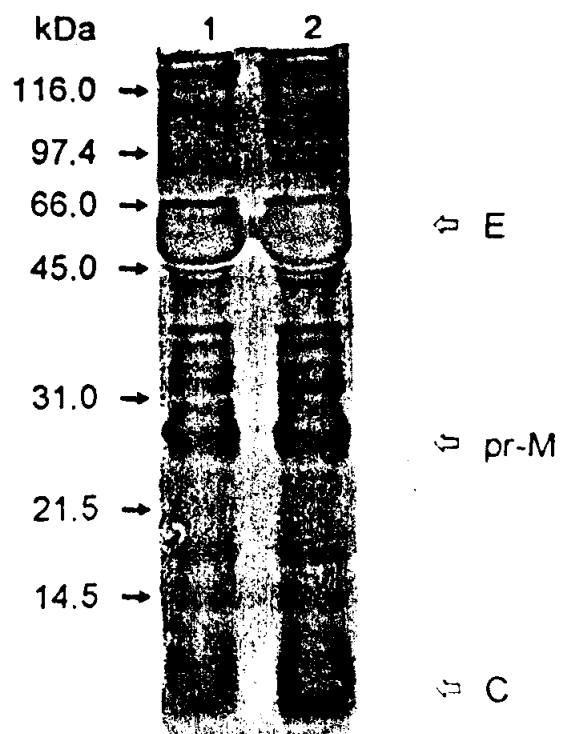
BAB V HASIL DAN PEMBAHASAN

5.1 Hasil Penelitian

Untuk mengetahui berat molekul (BM) protein struktural dari virus Dengue isolat Surabaya, pada penelitian ini telah dilakukan preparasi protein dengan teknik SDS-PAGE. Hasil preparasi protein terlihat pada Gambar 5.1 yang memperlihatkan pita-pita dari protein struktural berturut-turut dari atas ke bawah adalah protein E, prM dan C.

Pita protein E yang memiliki BM 52 kDa terletak antara marker dengan BM 45 - 66 kDa. Di bawah protein E adalah pita protein prM dengan BM 26 kDa terletak antara marker dengan BM 21,5 - 31 kDa, sedangkan pita protein C terletak paling bawah dengan BM 14 kDa terletak pada marker di bawah dengan BM kurang dari 14,5 kDa. Dari ketiga pita protein terlihat bahwa protein E paling mendominasi dari seluruh protein struktural yang diekspresikan virus Dengue-3, dengan bentuk pita yang tebal dan intensitas warna yang tajam, baik pada kolom 1 atau 2. Sementara pita protein prM dan C terlihat diekspresikan dengan bentuk yang lebih tipis dan intensitas warna juga berkurang. Pada Gambar 5.2 dapat ditunjukkan hasil identifikasi protein struktural virus Dengue-3 isolat Surabaya dengan teknik *Western Blot* menggunakan antibodi poliklonal kelinci anti-Den-3. Ketiga protein dapat ditransfer pada membran nitroselulosa dan terikat secara spesifik terhadap antibodi anti-Den-3. Berturut-turut dari atas ke bawah adalah hasil transfer protein E, prM dan C, sesuai dengan BM dari masing-

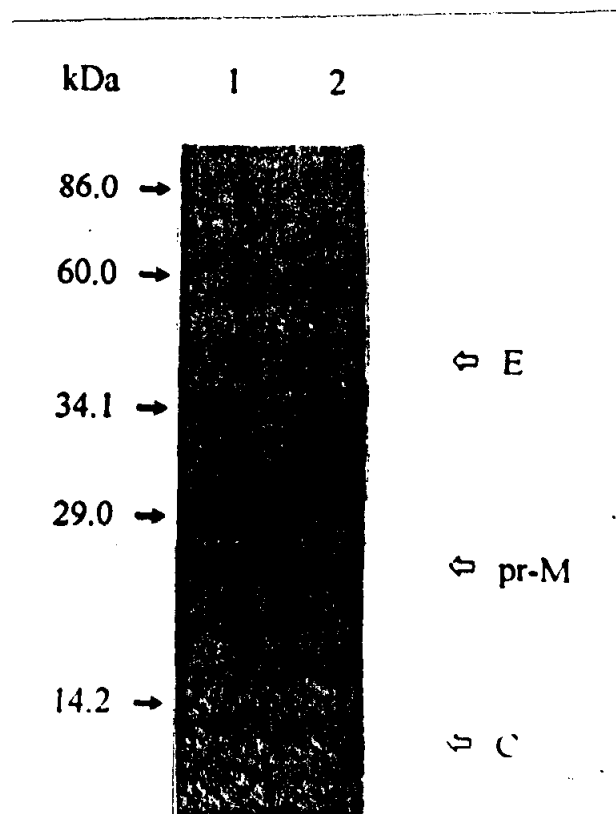
masing protein. Protein E bereaksi paling kuat di antara protein struktural dengan antibodi kelinci anti-Den-3 dibanding protein prM atau C.



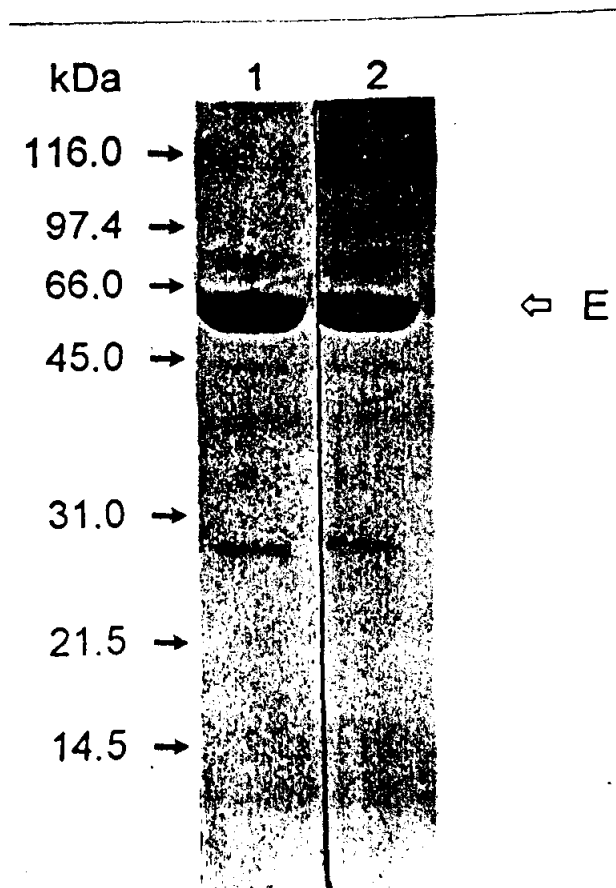
Gambar 5.1 Hasil preparasi protein struktural Virus Dengue-3 isolat Surabaya dengan teknik SDS-PAGE.

Setelah dilakukan pemotongan terhadap pita protein E dari gel yang tidak diwarnai, kemudian dilakukan isolasi dan dicek kembali dengan SDS-PAGE hasilnya dapat dilihat pada Gambar 5.3. Pada Gambar 5.3 telah dapat

dibuktikan bahwa protein E yang berhasil diisolasi membentuk satu pita protein yang tidak tercampur dengan protein prM ataupun C.



Gambar 5.2 Hasil karakterisasi protein struktural Virus Dengue-3 isolat Surabaya dengan teknik Western Blot.



Gambar 5.3 Hasil isolasi protein E Virus Dengue-3 isolat Surabaya yang dicek kembali dengan teknik SDS-PAGE.

5.2 Pembahasan

Dalam penelitian ini untuk isolasi protein E dari virus Dengue-3 isolat Surabaya dilakukan dengan teknik SDS-PAGE. Dari hasil penelitian telah dapat dikarakterisasi bahwa protein E memiliki BM 52 kDa. Beberapa peneliti menunjukkan bahwa BM protein E berkisar antara 54 - 62,9 kDa (Sittisombut, 1994; Rice, 1996). Adanya perbedaan variasi ini dapat

menyebabkan perbedaan karakter biologis pada strain yang berlainan, meskipun masih termasuk dalam satu serotipe (Igarashi, 1999).

Berdasarkan hasil *blotting* dengan teknik *Western Blot*, terlihat bahwa protein E dari virus Dengue-3 isolat Surabaya adalah protein antigenik. Hal ini dapat dibuktikan, ketika direaksikan dengan antibodi *rabbit anti-Den-3* dapat bereaksi secara spesifik, sehingga pada membran nitroselulose, pita protein E tampak mendominasi, dibanding pita protein prM atau C. Ngo *et al.*(1996) yang menggunakan protein virus Dengue untuk mendeteksi antibodi penderita dengan *Western Blot* dapat menunjukkan, bahwa urutan antigenitas dari protein struktural berbeda-beda. Urutan antigenik tertinggi dijumpai pada protein E dengan daya ikat terhadap antibodi penderita sebesar 100%, baik menggunakan protein dengan BM 60kDa atau protein yang terdegradasi/bentuk unglycosylated dengan BM 54 kDa. Sementara protein C-prM memiliki daya ikat 98,8%, protein prM sebesar 97% dan protein C sebesar 0%. Hal ini menunjukkan bahwa protein E mempunyai peluang yang tinggi untuk digunakan sebagai bahan diagnostik karena kespesifikkannya terhadap antibodi penderita. Selain bersifat antigenik, protein E juga telah terbukti dapat menginduksi pembentukan antibodi netralisasi dan mampu mengaktifkan sel T sitotoksik (Tc) secara spesifik (Staropoli *et al.*, 1997; Konishi *et al.*, 1999).

Hasil penelitian ini, protein E yang diisolasi ini selanjutnya dapat dimanfaatkan untuk berbagai tujuan, antara lain untuk imunisasi dalam pembuatan antibodi monoklonal (Suwarno dkk., 1999), atau untuk pembuatan vaksin sub-unit (Rantam dkk., 1999). Pada penelitian ini protein

E dapat dipersiapkan sebagai komponen diagnostik terhadap DHF, misalnya dengan uji ELISA atau *Western Blot*.

BAB VI KESIMPULAN DAN SARAN

6.1 Kesimpulan

- 1) Protein E virus Dengue isolat Surabaya mempunyai berat molekul 52 kDa pada hasil preparasi dengan teknik SDS-PAGE.
- 2) Protein E virus Dengue isolat Surabaya adalah protein antigenik, yang secara spesifik mampu mengikat antibodi spesifik *rabbit anti-Den-3* pada *Western Blot*.

6.2 Saran

Berdasarkan karakter dari protein E dan daya antigeniknya terhadap antibodi secara spesifik, maka dapat disarankan bahwa protein E virus Dengue isolat Surabaya, disarankan untuk dapat digunakan sebagai bahan diagnostik terhadap kasus DHF. Untuk itu perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk mencoba membuktikan protein E virus Dengue isolat Surabaya ini sebagai bahan diagnostik pada kasus DHF, baik pada infeksi primer maupun sekunder.

DAFTAR PUSTAKA

- Harlow, E., and D. Lane. 1988. *Antibodies. A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Lab, New York.
- Igarashi, A. 1999. Current problem and future challenge of Dengue virus infection with special reference to the pathogenesis of Dengue Haemorrhagic Fever. New strategy in controlling and prevention of Dengue Fever/Dengue Haemorrhagic Fever in South East Asia. International Seminar on Dengue Fever/Dengue Haemorrhagic Fever. Tropical Disease Center, Airlangga University, Surabaya, Indonesia.
- Konishi, E., M. Yamaoka, Khin-Sane-Win, K. Takada, I. Kurane and P.W. Mason. 1999. DNA vaccines for Dengue and Japanese Encephalitis. New strategy in controlling and prevention of Dengue Fever/Dengue Haemorrhagic Fever in South East Asia. International Seminar on Dengue Fever/Dengue Haemorrhagic Fever. Tropical Disease Center, Airlangga University, Surabaya, Indonesia.
- Kuno, G. 1991. *A manual of reagents with the emphasis on dengue diagnosis*. Center for Disease Control Dengue Branch, San Juan Lab, Puerto Rico.
- Kuntarjanto. 1998. *Epidemiologi dan Penanggulangan Penyakit DBD di Jawa Timur Tahun 1993 s/d 1997*. Seminar Demam Berdarah Dengue, Tropical Disease Center, Universitas Airlangga, Surabaya.
- Kurane, I., A.L. Rothman, P.G. Livingston, S. Green, S.J. Gagnon, J. Janus, B.L. Innis, S. Nimmannitya, A. Nisalak, and F.A. Ennis. 1994. Immunopathologic mechanism of Dengue Haemorrhagic Fever and Dengue Shock Syndrome. *Arch. Virol.* 9: 59-64.
- Maneekarn, N. 1994. Current status of the knowledge on Dengue/Dengue Haemorrhagic Fever/Dengue Shock Syndrome in Thailand. IV. Diagnosis: Detections of antigen and nucleic acid. *Mosquito-Borne Diseases Bulletin.* 2: 55-60.
- Morita, K. 1999. Use of recombinant virus technique in studying Dengue virus pathogenesis. New strategy in controlling and prevention of Dengue Fever/Dengue Haemorrhagic Fever in South East Asia. International Seminar on Dengue Fever/Dengue Haemorrhagic Fever. Tropical Disease Center, Airlangga University, Surabaya, Indonesia.

- Ngo, M.M.I., S.Y.S. Thoe, and A.E. Ling. 1996. Immune responses of Dengue Virus infected human sera. Symposium Ducth Foundation, Surabaya.
- Rantam, F.A. 1998. Aspek Virologi Demam Berdarah Dengue (DBD). Seminar Demam Berdarah Dengue, Tropical Disease Center, Surabaya.
- Rantam, F.A., Soetjipto, and Y.P. Dahlan. 1999. Envelope (E) protein is once alternative of a new generation of vaccines development of Dengue virus. New Strategy in controlling and prevention of Dengue Fever/Dengue Haemorrhagic Fever in Sout East Asia. International Seminar on Dengue Fever/Dengue Haemorrhagic Fever. Tropical Disease Center, Airlangga University, Surabaya.
- Rice, C.M. 1996. Flaviviridae : The viruses and their replication. Fieldy Virology, Third edition. 931 - 942. Sangkawibha, N. 1994. Current status of the knowledge on Dengue/Dengue Haemorrhagic Fever/Dengue Shock Syndrome in Thailand. III. Diagnosis: virus isolation and serology. Mosquito-Borne Diseases Bulletin. 2: 47-54.
- Sittisombut, N. 1994. Current status of the knowledge on Dengue / Dengue Haemorrhagic Fever / Dengue Shock Syndrome in Thailand II. Actiology: Molecular Biology of Dengue Virus: Mosquito. Borne Diseases Bulletin. 11: 6-19.
- Soegijanto, S. 1998. Penatalaksanaan dan Sistem Rujukan Penderita Demam Berdarah Dengue pada Anak. Seminar Demam Berdarah Dengue, Tropical Disease Center, Surabaya.
- Soewondo, E.S. 1998. Demam Berdarah Dengue pada Orang Dewasa, Gejala Klinik dan Penatalaksanaannya. Seminar Demam Berdarah Dengue, Tropical Disease Center, Surabaya.
- Staropoli, I., M.P. Frenkel., F. Megret, and V. Deubel. 1997. Affinity-purified Dengue-2 virus envelope glycoprotein induces neutralizing antibodies and protective immunity in mice. Vaccine 15 : 1-9.
- Suroso, T. 1990. Pemberantasan Demam Berdarah Dengue. Lokakarya Penyusunan Strategi Penanggulangan Demam Berdarah dengan Peran serta Masyarakat. Depkes, RI. 7-16.

- Suroso, T. 1999. Epidemiological situation of Dengue Haemorrhagic Fever and it's control in Indonesia. New strategy in controlling and prevention of Dengue Fever/Dengue Haemorrhagic Fever in South East Asia. International Seminar on Dengue Fever/Dengue Haemorrhagic Fever. Tropical Disease Center, Airlangga University, Surabaya, Indonesia.
- Suwarno, F.A. Rantan, dan Y.P. Dahlan. 1999. Produksi antibodi monoklonal terhadap virus Dengue isolat Surabaya. I. Karakterisasi Protein E strain Den-3 sebagai imunogen. Laporan akhir penelitian Riset Pembinaan Iptek Kedokteran. Kerjasama antara FK Unair dengan Balitbangkes, Depkes, RI dan Lembaga Biologi Eijkman , Jakarta.
- Tung, Y.C., S.F. Chang, Y.C. Ko, H.Y. Chen and K.H. Lin. 1995. Comparison of the genetic variation in type I Dengue Virus isolates in Taiwan 1987-1992. Kaohsiung J. med. Sci. 11: 243-249.



1 DEC 2003