

1593

IR - PERPUSTAKAAN UNIVERSITAS AIRLANGGA

1593
P

SKRIPSI

**KARAKTERISASI PROTEIN IMUNOGENIK
VIRUS DENGUE-3 ISOLAT INDONESIA**



Oleh :

KARTIKA HATMISARI

SURABAYA - JAWA TIMUR

**FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA
1999**



1593
P

SKRIPSI

**KARAKTERISASI PROTEIN IMUNOGENIK
VIRUS DENGUE-3 ISOLAT INDONESIA**



Oleh :

KARTIKA HATMISARI

SURABAYA – JAWA TIMUR

**FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA
S U R A B A Y A
1999**

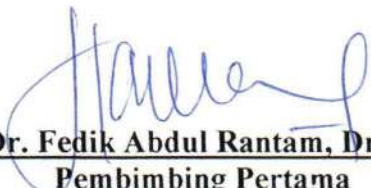
**KARAKTERISASI PROTEIN IMUNOGENIK
VIRUS DENGUE - 3 ISOLAT INDONESIA**

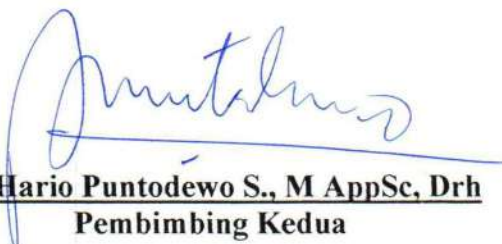
Oleh :

KARTIKA HATMISARI

069412042

**Menyetujui,
Komisi Pembimbing**

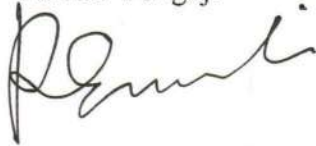

Dr. Fedik Abdul Rantam, Drh
Pembimbing Pertama


Dr. Hario Puntodewo S., M AppSc, Drh
Pembimbing Kedua

Setelah mempelajari dan menguji dengan sungguh-sungguh, kami berpendapat bahwa tulisan ini baik ruang lingkup maupun kualitasnya dapat diajukan sebagai skripsi untuk memperoleh gelar Sarjana Kedokteran Hewan.

Menyetujui,

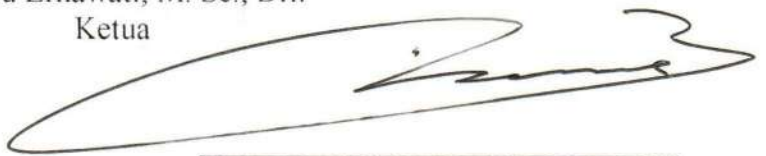
Panitia Penguji



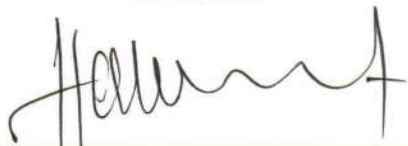
Rahayu Ernawati, M. Sc., Drh
Ketua



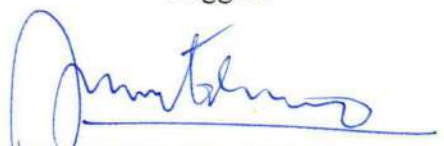
Suwarno, M. Si., Drh
Sekretaris



Dr. Bambang Sektiari L., DEA., Drh
Anggota



Dr. Fedik Abdul Rantam, Drh
Anggota



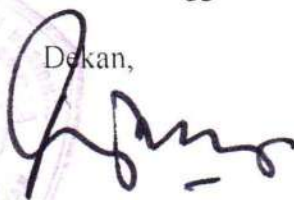
Dr. Hario Puntodewo S., M. AppSc., Drh
Anggota

Surabaya, 7 September 1999

Fakultas Kedokteran Hewan

Universitas Airlangga

Dekan,



Dr. Ismudiono, M.S., Drh

KATA PENGANTAR

Puji syukur kehadiran Allah SWT yang telah berkenan memberikan segala taufik dan hidayah-Nya , karena hanya dengan limpahan rahmat, berkah dan karunia-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan tulisan ini yang merupakan salah satu syarat memperoleh gelar Sarjana Kedokteran Hewan pada Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga.

Dalam penulisan yang berjudul Karakterisasi Protein Imunogenik Virus Dengue 3 Isolat Indonesia ini, penulis mencoba mempelajari karakter protein suatu virus dengan menggunakan sistem pemisahan protein yang saat ini sedang dikembangkan secara besar-besaran baik di lembaga-lembaga penelitian maupun di lingkungan perguruan tinggi. Upaya mengetahui karakter protein suatu virus merupakan langkah awal untuk mengetahui protein virus yang efektif dalam proses penginfeksi, sehingga dari langkah tersebut dapat dijadikan acuan dalam pembuatan vaksin.

Dalam penulisan ini penulis banyak menerima bimbingan dan bantuan dari berbagai pihak, oleh karena itu perkenankanlah dalam kesempatan ini penulis untuk menyampaikan rasa terima kasih yang sebesar-besarnya kepada yang terhormat:

1. Bapak Dr. Ismudiono, M.S., Drh selaku Dekan Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga atas kesempatan yang diberikan.

2. Bapak Dr. Fedik Abdul Rantam, Drh selaku pembimbing pertama dan Dr. Hario Puntodewo S, M AppSc, Drh selaku pembimbing kedua yang telah meluangkan waktu, tenaga dan pikiran untuk membantu penulis menyelesaikan tulisan ini.
3. Ibu Rahayu Ernawati, M.Sc., Drh selaku kepala laboratorium Virologi dan Imunologi, Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga, yang telah mengizinkan penulis untuk melakukan penelitian di laboratorium tersebut.
4. Bapak Prof. Dr. Yoes Prijatna Dachlan, M.Sc., dr selaku direktur Tropical Disease Center (TDC) Universitas Airlangga, yang telah mengizinkan penulis melakukan penelitian di laboratorium Dengue.
5. Bapak dan Ibu dosen dan karyawan laboratorium Virologi dan Imunologi Fakultas Kedokteran Hewan dan laboratorium Dengue TDC Universitas Airlangga yang telah membantu dalam penelitian ini.
6. Ayah, Bunda, Mbak Hannie, Mas Yudi dan Mas Budi tercinta yang telah banyak memberikan dorongan moril, materi dan doa restunya dalam penulisan ini.
7. Rekan-rekan dekatku Yussi, Manik, Inung, Veve dan semua rekan-rekan mahasiswa seangkatan yang telah memberikan kritik, saran dan bantuan kepada penulis.
8. Seluruh pihak yang tidak dapat disebut saru persatu yang telah membantu demi penyempurnaan tulisan ini.

Penulis menyadari sepenuhnya masih banyak terdapat kekurangan mengingat terbatasnya pengetahuan dan kemampuan yang penulis miliki. Oleh karena itu penulis

berharap adanya saran dan sumbangan pikiran dari para pembaca guna perbaikan tulisan ini.

Akhirnya penulis hanya mampu memohon kehadiran Allah SWT semoga amal kebaikan yang tidak ternilai harganya tersebut, mendapat balasan yang setimpal sebagai amal yang baik disisi-Nya. Semoga tulisan ini dapat bermanfaat bagi pembaca dan pihak-pihak yang memerlukan.

Surabaya, September 1999

Penulis

DAFTAR ISI

| BAB | | halaman |
|-----|---|---------|
| | DAFTAR ISI..... | vi |
| | DAFTAR GAMBAR..... | ix |
| | DAFTAR LAMPIRAN..... | x |
| i | PENDAHULUAN..... | 1 |
| | 1.1. Latar Belakang..... | 1 |
| | 1.2. Perumusan Masalah..... | 2 |
| | 1.3. Tujuan Penelitian..... | 3 |
| | 1.4. Manfaat Penelitian..... | 3 |
| | 1.5. Landasan Teori..... | 3 |
| II | TINJAUAN PUSTAKA..... | 4 |
| | 2.1. Demam Berdarah Dengue..... | 4 |
| | 2.1.1. Penyakit Demam Berdarah Dengue di beberapa benua..... | 5 |
| | 2.1.2. Penyakit Demam Berdarah Dengue di Indonesia..... | 6 |
| | 2.2. Virus Dengue..... | 7 |
| | 2.2.1. Isolasi virus Dengue..... | 9 |
| | 2.2.2. Replikasi virus Dengue..... | 10 |
| | 2.2.3. Daya ikat dan saat awal infeksi virus Dengue..... | 11 |

| | |
|--|----|
| 2.2.4. Akibat infeksi virus Dengue pada sel inang..... | 11 |
| 2.3. Patogenesis..... | 12 |
| 2.4. Respon Imun Infeksi Virus Dengue..... | 13 |
| 2.5. Diagnosa Laboratorium..... | 15 |
| 2.5.1. Pemeriksaan non spesifik..... | 15 |
| 2.5.2. Pemeriksaan spesifik..... | 16 |
| III MATERI DAN METODE..... | 17 |
| 3.1. Waktu dan Tempat Penelitian..... | 17 |
| 3.2. Materi Penelitian..... | 17 |
| 3.2.1. Bahan-bahan kimia..... | 17 |
| 3.2.2. Media..... | 17 |
| 3.2.3. Virus Dengue..... | 18 |
| 3.2.4. Serum..... | 18 |
| 3.2.5. Sel BHK ₂₁ clone ₁₃ | 18 |
| 3.2.6. Bahan dan alat..... | 18 |
| 3.3. Metode Penelitian..... | 19 |
| 3.3.1. Perbanyakkan sel monolayer BHK ₂₁ clone ₁₃ | 19 |
| 3.3.2. Inokulasi virus Dengue 3 pada kultur jaringan sel monolayer BHK ₂₁ clone ₁₃ | 20 |
| 3.3.3. Memanen virus Dengue 3 dalam sel BHK ₂₁ clone ₁₃ | 20 |
| 3.3.4. Membuat sel lysat..... | 21 |
| 3.3.5. SDS-PAGE..... | 21 |

| | | |
|----|--|----|
| | a. Mencetak <i>running gel</i> 12%..... | 21 |
| | b. Mencetak <i>stacking gel</i> 12%..... | 22 |
| | c. Menyiapkan sampel..... | 22 |
| | d. Elektrophoresis..... | 22 |
| | 3.3.6. <i>Western Blot</i> | 23 |
| | a. Semi dry elektrophoresis..... | 24 |
| | b. Immunoblotting..... | 24 |
| IV | HASIL PENELITIAN..... | 26 |
| | 4.1. Hasil SDS-PAGE..... | 26 |
| | 4.2. Hasil <i>Western blot</i> | 27 |
| V | PEMBAHASAN..... | 31 |
| VI | KESIMPULAN DAN SARAN..... | 36 |
| | 6.1. Kesimpulan..... | 36 |
| | 6.2. Saran..... | 36 |
| | RINGKASAN..... | 37 |
| | DAFTAR PUSTAKA..... | 38 |
| | LAMPIRAN..... | 41 |

DAFTAR GAMBAR

| Gambar | | halaman |
|---------------|---|----------------|
| 1. | Perkiraan daerah yang berpotensi bagi penyebaran <i>Ae. Aegypti</i> | 6 |
| 2. | Struktur genom virus Dengue..... | 8 |
| 3. | Struktur protein virus Dengue intraseluler dan ekstraseluler..... | 9 |
| 4. | Mekanisme patogenesis dari Kurane dan Ennis..... | 13 |
| 5. | Respon imun terhadap virus Dengue yang memberikan kontribusi dalam mengontrol infeksi virus dan patogenesis DBD..... | 15 |
| 6. | Hasil SDS-PAGE 12%..... | 29 |
| 7. | Hasil <i>Western blot</i> | 30 |

DAFTAR LAMPIRAN

| Lampiran | halaman |
|---|----------------|
| 1. Bagan alir jalannya penelitian..... | 41 |
| 2. Komposisi bahan-bahan kimia yang digunakan dalam penelitian..... | 42 |
| 3. Beberapa peralatan untuk penelitian..... | 45 |

BAB I

PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Demam Berdarah Dengue (DBD) adalah penyakit infeksi yang disebabkan oleh virus Dengue yang ditandai dengan demam mendadak tinggi terus-menerus sepanjang hari disertai pendarahan spontan dan kecenderungan terjadi *shock* yang dapat berakibat fatal (Anonimus, 1997).

Sampai saat ini dikenal ada empat serotipe virus Dengue, yaitu : Den-1, Den-2, Den-3 dan Den-4. Keempat serotipe ini terdapat di Indonesia dan dilaporkan bahwa tipe virus Den-3 sering menimbulkan wabah (Sumarmo, 1987).

Menurut Abednego pada tahun 1993 bahwa salah satu upaya yang efektif untuk mencegah penyakit DBD adalah memberantas vektor atau nyamuk penularnya, yaitu nyamuk *Ae. aegypti* dan *Ae. albopictus* yang biasanya hidup, tinggal dan berkembang di dalam rumah (Achmad, 1998). Penyuluhan dan gerakan pemberantasan sarang nyamuk DBD kurang efektif di beberapa daerah, maka pada akhir tahun 1997 dan awal 1998 telah terjadi peningkatan kasus yang bermakna (kejadian luar biasa), sejak bulan Nopember 1997 sampai April 1998 di 11 Propinsi, 20 Dati II, 33 Kecamatan, dengan jumlah penderita 7.585 dan angka kematian mencapai 207 jiwa (Achmad, 1998).

Adanya kejadian itu, maka perlu adanya tindakan alternatif dengan menciptakan vaksin Dengue yang spesifik, tidak terjadi intervensi satu sama lain, mampu melindungi dari semua serotipe dan dapat menginduksi dalam waktu yang cukup lama. Virus Dengue sangat patogen, mempunyai reaksi silang yang kuat satu sama lain dengan tingkat morbiditas dan mortalitas yang tinggi. Selain itu, virus bersifat tidak stabil, sehingga dapat terjadi reaktivasi dan kemungkinan adanya intervensi diantara serotipe yang disertai adanya infeksi heterotipe. Virus Dengue secara serologi mempunyai sepuluh macam protein: Capsid (C), Premembran (pr-M), Envelope (E), Non Struktural 1(NS1), NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B dan NS5. Berdasarkan beberapa sifat virus di atas, tindakan yang dilakukan untuk menciptakan vaksin tersebut adalah menemukan protein yang imunogenik terhadap keempat serotipe virus Dengue, nantinya digunakan sebagai bahan vaksin sub unit (Ng.M.L *et al.*, 1996).

Berdasarkan latar belakang tersebut peneliti mencoba melakukan penelitian tentang karakterisasi protein yang imunogenik terhadap virus Dengue 3. Diharapkan dari penelitian tersebut dapat membantu dalam penemuan vaksin sub unit untuk pencegahan penyakit DBD.

1.2. Rumusan Masalah

1. Protein mana yang imunogenik terhadap virus Dengue 3 ?
2. Kapan protein tersebut diekspresikan ?

1.3. Tujuan Penelitian

Penelitian ini bertujuan untuk mengkarakterisasi protein yang imunogenik, kemudian dianalisa dengan *Western blot* yang nantinya dapat digunakan sebagai kandidat vaksin Dengue isolat Indonesia.

1.4. Manfaat Hasil Penelitian

Melalui karakterisasi virus Dengue 3 dapat diketahui jenis protein yang imunogenik terhadap virus Dengue isolat Indonesia khususnya serotipe 3, dengan demikian dapat digunakan sebagai acuan untuk memproduksi vaksin sub unit.

1.5. Landasan Teori

Virus Dengue terdiri dari 4 serotipe (Den-1, Den-2, Den-3 dan Den-4) yang sifat antigeniknya tidak sama dan mempunyai 10 macam protein (C, pr-M, E, NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B dan NS5) yang sangat berperan dalam infeksi virus Dengue, serta bersifat imunogenik pada host. Infeksi dengan salah satu serotipe hanya akan memberikan kekebalan untuk serotipe tersebut, tetapi tidak memberikan kekebalan silang penuh untuk serotipe lain (Henchal dan Putnak, 1990).

Protein E, C dan pr-M merupakan protein struktural yang pertama kali berperan pada proses penginfeksi virus ke sel (Fenner *et al.*, 1993). Beberapa protein struktural memiliki fungsi netralisasi, sehingga protein tersebut secara tidak langsung berperan sebagai antibodi (Rice, 1996), sedangkan protein non struktural terlibat dalam pengaturan siklus replikasi (Fenner *et al.*, 1993)

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Demam Berdarah Dengue (DBD)

Demam Berdarah Dengue mempunyai beberapa sinonim yaitu *Breck-bone Fever*, *Dandy Fever*, *Denguero*, *Bouquet Fever*, *Giraffe Fever*, *Polka Fever*, *5-day Fever*, *7-day Fever*, *Joint Fever* (di Indonesia), *Bilious Remitting Fever* (di Philadelphia). Semenjak abad ke-19 tepatnya tahun 1869 oleh *Royal College Physicans* di London, nama *Dengue* ditetapkan untuk digunakan di seluruh dunia (Sabin, 1986).

Demam Berdarah Dengue adalah suatu penyakit yang ditularkan melalui gigitan nyamuk yang mengandung virus Dengue. Gejala yang tampak adalah demam, kelemahan, kesakitan yang bervariasi di beberapa bagian tubuh, nafas menjadi cepat, limfadenopati dan leukopenia (Sabin, 1986).

Menurut Brancaft pada tahun 1906 nyamuk *Ae. aegypti* bertindak sebagai vektor dari penyakit Dengue, sedangkan Simon *et.al.* pada tahun 1931 menyatakan *Ae. albopictus* sebagai vektor Dengue. Kenyataannya masih banyak spesies nyamuk lain yang dapat bertindak sebagai vektor, misalnya spesies dari *Anopheles* dan *Culex*. Vektor yang sering menularkan penyakit DBD adalah *Ae. aegypti* dan *Ae. albopictus*. Nyamuk tersebut merupakan parasit yang termasuk dalam ektoparasit penghisap darah manusia karena mempunyai sifat antropofilik (dekat dengan manusia).

Aedes aegypti dan *Ae. albopictus* hidup, tinggal serta berkembang biak di dekat manusia. Nyamuk tersebut selalu hidup di dalam rumah sehingga anak-anak dan orang dewasa merupakan sasaran terjangkau penyakit DBD (Anonimus, 1997).

2.1.1. Penyakit Demam Berdarah Dengue di beberapa benua

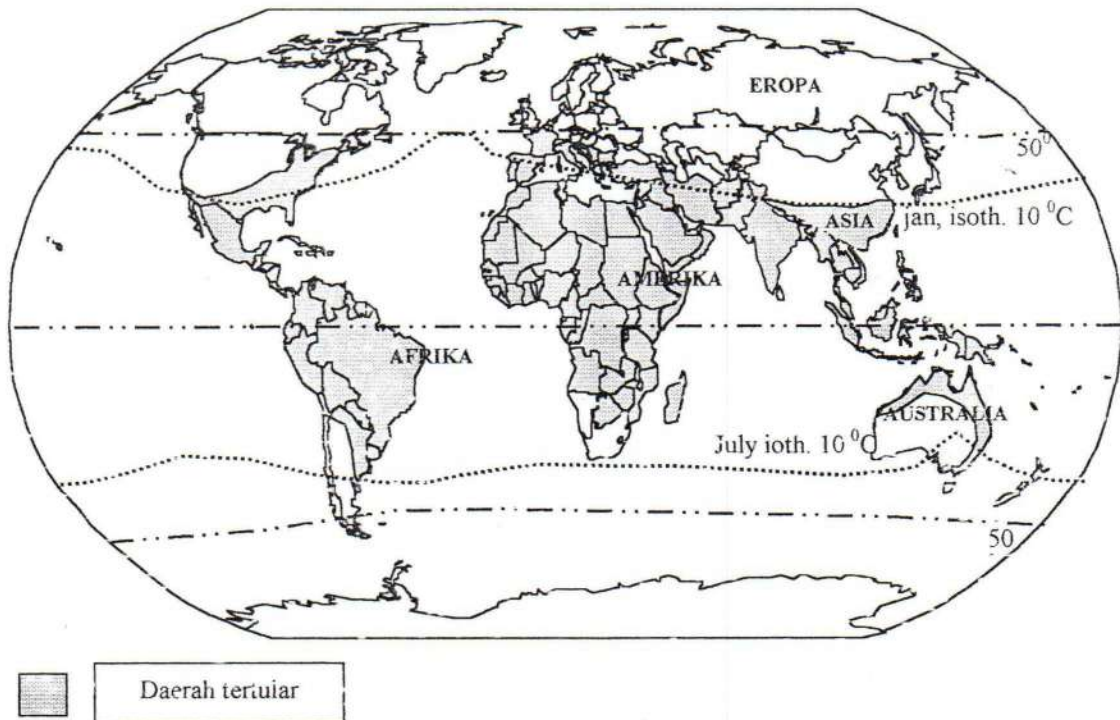
Demam Berdarah Dengue sudah merupakan endemik sejak abad ke-18. Hampir semua negara yang terjangkau penyakit ini selalu mengalami ledakan kasus. Misalnya pada tahun 1981, Cuba mengalami ledakan kasus terbesar untuk wilayah Amerika dengan jumlah kasus 344.203 dan angka kematian mencapai 158 dimana 101 korban dari anak-anak. Tahun 1989 sampai tahun 1993 di Venezuela merupakan kasus terbesar ke-2 setelah Cuba dengan total penderita 11.260 dan angka kematian mencapai 136 jiwa. Virus Dengue yang berhasil diisolasi dari Cuba dan Venezuela adalah serotipe Den-1, Den-2 serta Den-4 (Anonimus, 1997).

Daerah Afrika dan Mediterania Timur dari Eropa juga merupakan daerah yang beresiko tinggi terjangkau DBD. Semenjak tahun 1967 virus Dengue sudah menyebar di Angola, Burkina Faso, Comoros, Cote d'Ivoire, Congo, Djibouti, Ethiopia, Ghana, Guinea, Kenya, Madagascar, Mauritius, Mozambique, Nigeria, Pakistan, Reunion, Saudi Arabia, Senegal, Seychelles, Sierra Leone, Somalia, Sudan dan Tanzania (Anonimus, 1997).

Pola aktivitas epidemik dari DBD biasanya mengaiami peningkatan jumlah kasus setiap 2 – 5 tahun sekali. Selain itu, banyaknya serotipe virus Dengue di suatu

daerah urban dapat menyebabkan peningkatan jumlah kasus (Sumarmo, 1987).

Berikut ditunjukkan gambar daerah yang potensial terjangkitnya DBD.



Gambar 1. Perkiraan daerah yang berpotensi bagi penyebaran *Ae. Aegypti*
Sumber : Anonimus (1997).

2.1.2. Penyakit Demam Berdarah Dengue di Indonesia

David Bylon menyebutkan bahwa penyakit DBD pertama kali mewabah di Indonesia pada tahun 1779, yaitu di Batavia (Sabin, 1986). Pada tahun 1968 di Jakarta dan Surabaya dilaporkan terjadi ledakan kasus. Hingga saat ini DBD telah menjadi endemis di seluruh Indonesia dan cenderung meningkat jumlah kasusnya (Sumarmo, 1987).

Demam Berdarah Dengue umumnya menyerang anak sehingga sering disebut atau digolongkan penyakit anak, akan tetapi kalau diamati ternyata orang dewasa pun dapat terserang penyakit ini. Di Indonesia DBD yang menyerang orang dewasa pertama kali dilaporkan dari Jakarta, Jawa-Barat, Semarang dan Surabaya (Soewando, 1997).

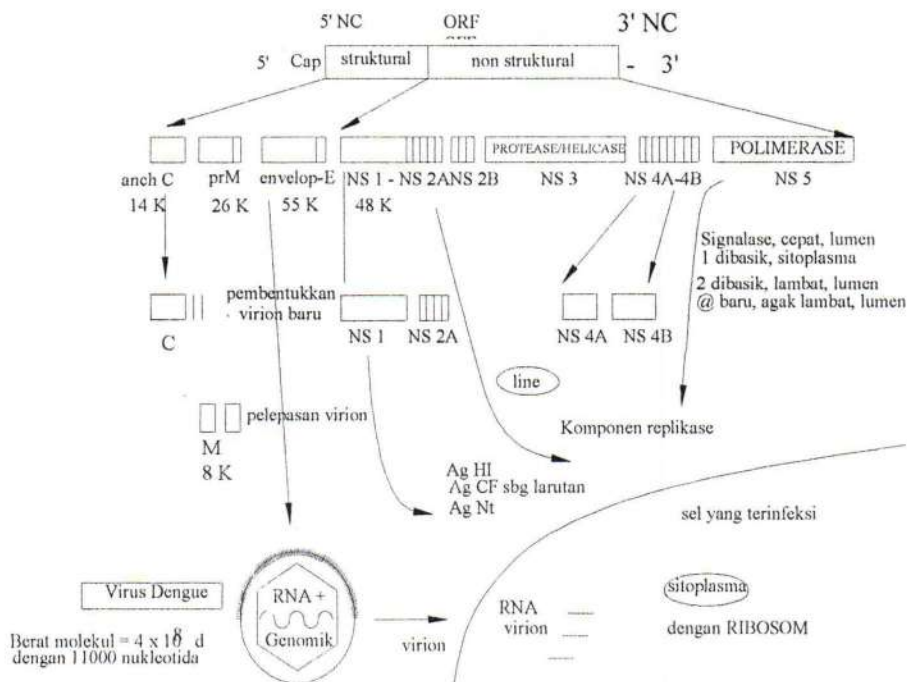
Musim penularan di Indonesia biasanya angka penderita meningkat setiap akhir tahun, mulai bulan Nopember dan mencapai puncak pada bulan Desember sampai Januari. Namun untuk beberapa kota besar seperti Jakarta, Bandung, Yogyakarta dan Surabaya kasus DBD akan meningkat pada bulan Mei atau Juli, setelah itu akan menurun kembali pada situasi kasus normal bulanan (Achmad, 1998).

2.2. Virus Dengue

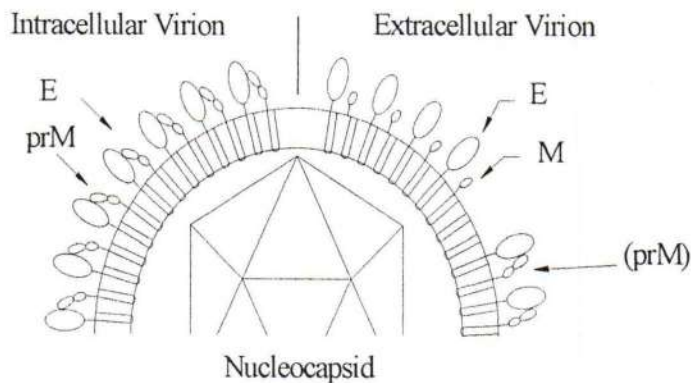
Virus Dengue merupakan famili *Flaviviridae* dengan genus *Flavivirus*, memiliki empat serotipe, yaitu: Den-1, Den-2, Den-3 dan Den-4. Virion terdiri dari genom yang dikelilingi oleh nukleokapsid dan merupakan *single stranded* RNA. Virus Dengue memiliki empat protein struktural yaitu : Capsid (C), Membrane (M), Pre-membran (pr-M) dan Envelope (E), selain itu juga memiliki tujuh protein non struktural, yaitu : NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B dan NS5. (Henchal dan Putnak, 1990).

Virus Dengue termasuk virus kecil dengan berat molekul 4×10^8 dalton serta berdiameter kira-kira 50 nm (Anonimus, 1997), berstruktur sferik dan memiliki

nukleokapsid helikal. Komposisi virion terdiri dari 6 % RNA, 66 % protein, 9 % karbohidrat dan 17 % lipid. Berat molekul protein E 55 kd (kilodalton), C 14 kd, M 8 kd, pr-M 26 kd, NS1 48 kd, NS2A 24 kd, NS2B 27 kd, NS3 68 – 70, NS4A dan NS4B 28 – 30 kd, dan NS5 104 – 104 kd. Protein Envelope (E) dan Membrane (M) adalah membran tipe protein yang menempel dalam lapisan lipid pada hidropobik C-terminal. Protein Capsid (C) merupakan protein penyusun nukleokapsid dari virion. Partikel virus yang imature mengandung pr-M dan sedikit infeksius daripada virion (Rice, 1996). Struktur genom virus Dengue dan struktur protein virus Dengue intraseluler dan ekstraseluler dapat ditunjukkan pada gambar dibawah ini.



Gambar 2. Struktur Genom Virus Dengue
Sumber : Rantam (1998).



Gambar 3. Struktur protein virus Dengue intraseluler dan ekstraseluler
Sumber : Chambers et al. (1991).

2.2.1. Isolasi virus Dengue

Di Indonesia, Den-1, Den-2 dan Den-3 berhasil diisolasi dari darah penderita sewaktu terjadi wabah di Semarang pada tahun 1973, pada waktu bersamaan keempat serotipe virus Dengue juga berhasil diisolasi di Jakarta dari darah penderita. Virus Den-1 dan Den-2 berhasil diisolasi dengan menyuntikkan darah penderita secara intrakutan pada anak tikus putih umur 1 hari. Virus Den-3 dan Den-4 diisolasi langsung dengan menggunakan anak tikus putih umur 1 hari yang disuntik intraserebral dengan darah penderita. Sekarang ini selain tikus putih dapat pula dipakai kultur jaringan LKCMK 2 (*Lili Laboratory Cell Monkey Kidney*), sel BHK (*Baby Hamsters Kidney*), vero dan jaringan nyamuk untuk mengisolasi virus. Sensitifitas isolasi tergantung pada macam serotipe virus, macam biakan jaringan, asal biakan jaringan dan jumlah pasase biakan jaringan (Sumarmo, 1987).

2.2.2. Replikasi virus Dengue

Virus masuk ke dalam sel melalui endositosis diperantarai reseptor. Replikasi berlangsung dalam sitoplasma dan berjalan agak lambat. Replikasi meliputi sintesis dari molekul komplementer beruntai plus (berfungsi sebagai *messenger* RNA/ mRNA), yang selanjutnya bertindak sebagai cetakan. Dalam sintesis, lebih banyak lagi molekul beruntai plus yang tidak berkapsid. Selama infeksi, sintesa untai plus menonjol, yang menunjukkan adanya mekanisme pengaturan yang rumit dan melibatkan penyusunan sel inang. RNA genom yang terbentuk secara langsung bertindak sebagai mRNA mengandung satu kerangka pembacaan terbuka yang lebih besar dari 10 kb dan ditranslasi secara tuntas dari ujung 5' untuk menghasilkan prekursor poliprotein yang besar dan selanjutnya memisah dan dimodifikasi untuk menghasilkan protein virus tersendiri. Sekitar sepertiga panjang RNA genom dari ujung 5'-nya menyandi tiga protein struktural (C, protein nukleokapsid; pr-M, precursor terglykosilasi yang memisah menjadi M, protein transmembran; dan E, glikoprotein peplomer utama), dan dua pertiganya menyandi sejumlah protein tidak berstruktur (NS1, yang terlibat di dalam sintesa virus dan perakitan serta pelepasan virion, NS2A, NS2B, NS3 dan NS5 yang menjadi bagian dari polimerase RNA, NS4A dan NS4B). Perakitan virion pada sel vertebrata berlangsung pada membran retikulum endoplasma, sedangkan pada sel nyamuk terjadi pada membran plasma, tetapi bakal kapsid tidak terlihat. Namun, virion yang terbentuk dengan sempurna terdapat dalam retikulum endoplasma dan dilepaskan melalui perusakan sel (Fenner *et al.*, 1993).

2.2.3. Daya ikat dan saat awal infeksi virus Dengue

Proses daya ikat dan proses awal infeksi virus Dengue pada sel adalah tergantung adanya ADE (*Antibody Dependent Enhancement*). Setelah virus diikat oleh ADE, virion diambil oleh RME (*Receptor Mediated Endocytosis*), terjadi fusi secara langsung pada membran plasma kemudian terjadi pelepasan selubung nucleokapsid dan translasi genom RNA. Protein E dengan pH rendah memegang peranan pada proses tersebut, karena dapat mendorong fusi virion dengan liposome membran (Rantam, 1998).

2.2.4. Akibat infeksi virus Dengue pada sel inang

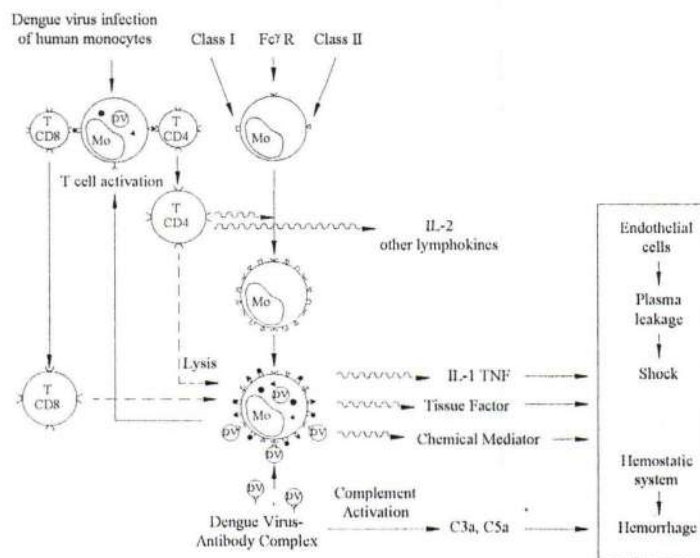
Virus Dengue dapat dibiakan pada sel mamalia seperti BHK₂₁ clone₁₃ dan sel ginjal kera (sel vero), sel avian, sel artropoda dan sel nyamuk *Ae. albopictus* (C6 / 36) (Sumarmo, 1987).

Biakan sel yang telah diinokulasi dengan virus Dengue terdapat perbedaan, yaitu ada atau tidaknya CPE (*cytopathogenic effect*). Perbedaan ini sangat tergantung pada tipe selnya. Pada sel vertebrata dapat terjadi CPE dan perubahan struktur termasuk vakuolisasi serta degenerasi membran intraseluler, sedangkan pada sel nyamuk seringkali CPE tidak tampak, sehingga mengakibatkan infeksi persisten. Pada biakan sel arthropoda dapat menimbulkan terbentuknya CPE tetapi sebagian besar hanya terlihat adanya sel fusi dan syncitium. Walaupun umumnya penginfeksi virus pada sel bersifat sitosidal dan beberapa virus tidak tampak CPE, tetapi infeksi yang ditimbulkan bersifat kronis (Rantam, 1998).

2.3. Patogenesis

Patogenesis DBD merupakan proses imunopatologis. Ada empat hipotesis mengenai DBD (Soewondo, 1998). Hipotesis pertama : DBD dapat terjadi apabila terinfeksi ulang dengan virus Dengue yang serotipe virusnya berbeda dengan infeksi pertama (infeksi primer) (Sumarmo, 1987). Hipotesa kedua : DBD dapat timbul akibat infeksi virus Dengue dengan serotipe yang ganas (Sumarmo, 1987). Hipotesa ketiga : Antigen antibodi kompleks / kompleks imun yang terbentuk akan merangsang komplemen yang kemudian akan mengeluarkan bahan mediator C_{3a} dan C_{5a} anaphylatoxin yang mempunyai efek farmakologis cepat dan pendek. Bahan ini bersifat vasoaktif dan prokoagulasi sehingga menimbulkan kebocoran plasma (shock hipovolumik) dan pendarahan (Swette, 1987). Hipotesa keempat : sel target untuk replikasi virus Dengue adalah sel fagosit mononuklear yang membawa Fc (*fraction complement*)-reseptor dipermukaannya. Infeksi aktif pada penderita yang telah mempunyai antibodi (Ig G) terhadap virus Dengue akibat infeksi sebelumnya akan membentuk kompleks imun, lebih mudah masuk ke dalam sel-sel mononuklear tersebut dibanding dengan virus bebas. Akibatnya di dalam tubuh penderita akan terdapat banyak sel mononuklear yang mengandung virus Dengue dalam jumlah yang lebih banyak. Proses replikasi virus di dalam sel mononuklear akan merangsang sel T memori yang telah teraktifasi, yang akan mengadakan proliferasi menjadi sel T-4 dan T-8 sitotoksis yang akan mengenal dan akan menghancurkan virus-virus Dengue yang ada di dalam sel-sel fagosit mononuklear, maka terjadinya proses pembersihan secara imunologis. Proses ini akan berdampak negatif karena akan melepaskan bahan

mediator yang memiliki sifat vasoaktif atau prokoagulasi, misalnya: *interleukin*, *tumor necrotizing factor (TNF)*, *platelet activating factor (PAF)*. Bahan mediator tersebut akan mempengaruhi sel-sel endotel dinding pembuluh darah dan hemostatik yang akan mengakibatkan kebocoran plasma dan perdarahan (Kurane dan Ennis, 1992).



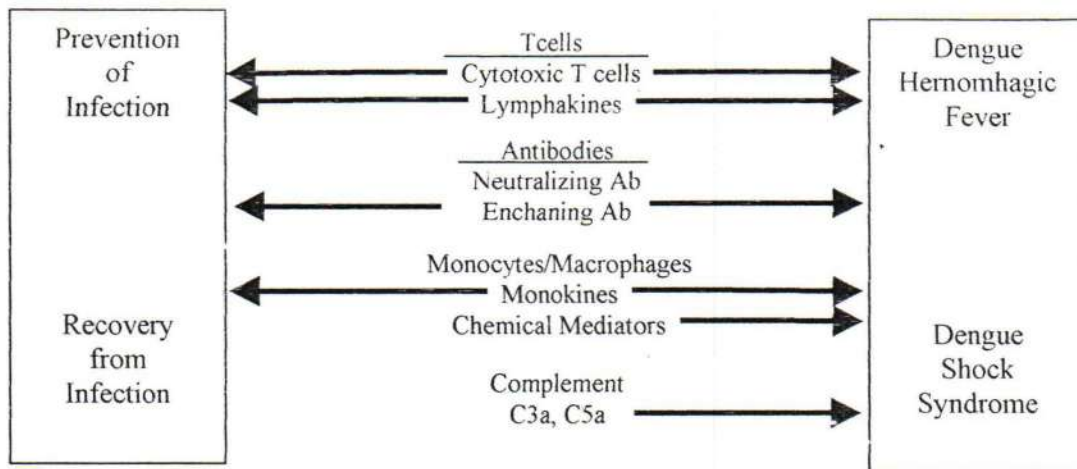
Gambar 4. Mekanisme patogenesis virus Dengue

Sumber : Kurane dan Ennis (1992).

2.4. Respon Imun Infeksi Virus Dengue

Setelah virus Dengue masuk dalam tubuh melalui gigitan vektor infeksi, virus berkembang biak dalam sel retikulum endoplasma yang selanjutnya diikuti adanya viremia yang berlangsung sekitar 5-7 hari. Masa inkubasi virus sulit untuk diisolasi, karena jumlah virus masih sedikit. Virus mudah untuk diisolasi saat demam 2-3 hari karena jumlahnya dalam aliran darah meningkat (Sumarmo, 1987).

Akibat adanya infeksi dari virus ini maka timbul adanya respon imun baik itu humoral maupun seluler antara lain : antinetralisasi, antihemaglutnin, antikomplemen. Antibodi ini pada umumnya adalah kelas Ig G disamping itu juga Ig M. Antibodi Ig M ini muncul setelah beberapa hari terinfeksi Dengue dan bertahan sampai beberapa bulan. Jika terinfeksi ulang oleh virus Dengue dengan tipe yang berbeda, maka antibodi yang timbul tidak hanya tertuju pada infeksi yang kedua, tetapi juga tertuju pada infeksi yang pertama, sehingga memberikan efek booster (*boosting effect*) tetapi hanya pada antibodi kelas Ig G. Respon imun sebenarnya mempunyai arti penting dalam menetralisasi infeksi virus ke dalam tubuh, tetapi lain halnya dengan virus Dengue, di mana respon imun mempunyai respon yang bertentangan, yang berarti pertama sebagai pencegahan infeksi virus Dengue dan melindungi dari infeksi, kedua berfungsi sebagai imunopatologi dari DBD / DSS. Hal ini dapat diterangkan secara skematis di bawah ini (Rantam, 1998).



Gambar 5. Respon imun terhadap virus Dengue yang memberikan kontribusi dalam mengontrol infeksi virus dan patogenesis DBD
Sumber : Rantam (1998).

2.5. Diagnosa Laboratorium

Pasien yang diduga terinfeksi virus Dengue dapat dilakukan 2 (dua) macam pemeriksaan yaitu: pemeriksaan non spesifik dan spesifik.

2.5.1. Pemeriksaan non spesifik

Pada setiap penderita yang diduga terinfeksi virus Dengue dilakukan pemeriksaan lengkap meliputi pemeriksaan darah, tinja dan air seni, sedangkan penderita secara klinis disangka menderita DBD dilaksanakan pemeriksaan hemoglobin, hematokrit dan trombosit. Di samping pemeriksaan rutin pada beberapa penderita dilakukan juga pemeriksaan hematologis lain yaitu pemeriksaan biopsi sumsum tulang belakang, waktu protrombin dan waktu tromboplastin parsial, pemeriksaan kadar elektrolit, kalium, natrium dan klorida plasma/serum, analisis gas

darah dan pemeriksaan faal hati. Apabila dianggap perlu dikerjakan pemeriksaan khusus diantaranya pemeriksaan cairan serebrospinal (Sumarmo, 1987).

2.5.2. Pemeriksaan spesifik

Pemeriksaan spesifik meliputi pemeriksaan serologi dan virologi. Prosedur serologi utama yang digunakan dalam virologi adalah ELISA (*Enzym Linked Immunosorbent Assay*), *radioimunoasai*, *Western blot*, netralisasi virus, hambatan hemaglutinasi, imunofluoresensi dan imunodifusi (Fenner *et al.*, 1993). Untuk DBD, pemeriksaan serologi yang sering dilakukan antara lain: uji hambatan hemaglutinasi, uji pengikatan komplemen, uji netralisasi, uji dot blot dan uji ELISA. Pemeriksaan virologi yang sering dilakukan : deteksi antigen, PCR (*polymerase chain reaction*), isolasi virus (Anonimus, 1997).

BAB III

MATERI DAN METODE

3.1. Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan selama enam bulan, mulai tanggal 20 Oktober 1998 sampai 20 Mei 1999, di Laboratorium Virologi dan Imunologi Fakultas Kedokteran Hewan dan Laboratorium Dengue Tropical Disease Center (TDC) Universitas Airlangga, Surabaya.

3.2. Materi Penelitian

3.2.1. Bahan-bahan kimia

PBS (*Phospat Buffer Saline*), Tripsin 0.25%, *running gel* 12%, *stacking gel* 12%, NP 40 0.5%, pewarna silver, electrophoresis buffer, transfer buffer, BSA (*Bovine Serum Albumin*) 1%, fast-red, pengembang warna, laemmli buffer dan butanol 50%, Prestained, Naphthol –As – Mx Phospat (Sigma).

3.2.2. Media

MEM (*Minimal Essential Medium*)

Dalam 50 ml media pertumbuhan sel perlu ditambahkan :

| | |
|-------------------------------------|--------|
| FCS (<i>Fetal Calf Serum</i>) 10% | 5.0 ml |
| Streptomycin 1% | 0.5 ml |

3.2.3. Virus

Virus Dengue serotipe 3 didapat dari Lab. Dengue TDC UNAIR (yang berasal dari isolasi pasien yang sakit DBD di rumah sakit Dr. Sutomo Surabaya) dan US-NAMRU-2 (United States Naval Medical Research Unit No. 2) Jakarta.

3.2.4. Serum

Serum yang digunakan diperoleh dari serum kelinci yang telah diinfeksi dengan virus Den-3 sebanyak 2 kali, dengan dosis 1 M.O.I (*Multiplicity Of Infection*) setelah 21 hari darah diambil melalui telinga \pm 5 cc, kemudian didiamkan sampai darah tadi keluar serumnya (antibodi I). Konjugat yaitu fragment Ig G α (anti) kelinci berlabel enzim alkalin phosphatase (antibodi II).

3.2.5. Sel BHK₂₁ clone 13 (*Baby Hamsters Kidney*)

Sel BHK₂₁ Clone 13 adalah *established cell line* yang dibuat dari ginjal anak hamster yang telah di pasasikan berpuluh-puluh kali dari *Capstick 62*, sehingga sifat-sifat selnya tidak mudah diubah lagi.

3.2.6. Bahan dan alat

Bahan dan alat yang digunakan untuk penelitian adalah sebagai berikut:

Gelas Beaker 100 ml, pipet hisap 1 ml; 5 ml; 10 ml, Erlenmeyer 100 ml, eppendorf tube 1.8 ml, Petridish berdiameter 6 cm; 9 cm, mikroskop inverted,

inkubator CO₂ 5%, laminar flow cabinet, api bunsen, freezer, lemari es, electroblotting transfer apparatus, gelas plate bersekat, *comb*, vertical gel elektroforesis apparatus, sentrifuse, shaker, aluminium foil, kertas saring, kertas filter dan membran nitroselulosa.

3.3. Metode Penelitian

3.3.1. Perbanyak sel monolayer BHK₂₁ clone₁₃

Untuk perbanyak sel BHK₂₁ clone₁₃ yang perlu diperhatikan adalah umur sel, persentase pertumbuhan sel dan sterilisasi bahan dan alat. Umur sel yang paling baik adalah tidak lebih dari 48 jam dan persentase pertumbuhan lebih dari 80%. Cara perbanyak sel adalah membuang media sel yang pertumbuhannya mencapai 80% atau lebih, kemudian menambahkan 0.8 ml Trypsin 0.25% agar sel lepas satu persatu dari dinding Petridish. Langkah selanjutnya adalah menambahkan 12 ml medium MEM untuk dibagi menjadi 3 Petridish. Tahap akhir dari proses ini adalah memberi kode pada masing-masing Petridish yang terdiri dari nama sel, berapa kali pasase, tanggal pembiakan dan nama pemilik. Kemudian menginkubasi Petridish dalam inkubator CO₂ 5% dengan temperatur 37 °C sampai sel menjadi monolayer dan tumbuh merata.

3.3.2. Inokulasi virus Den-3 pada kultur jaringan sel monolayer BHK₂₁ clone₁₃

Sel BHK₂₁ clone₁₃ yang memperlihatkan persentase pertumbuhan lebih dari 80%, dapat digunakan untuk inokulasi virus. Hal itu bertujuan agar biakan virus dapat menghasilkan CPE yang karakteristik. Observasi dan koleksi virus dilakukan pada 2, 6, 12, 24, 48 dan 72 jam pasca inokulasi virus. Cara melakukan inokulasi adalah menyiapkan 6 Petridish yang mengandung persentase pertumbuhan sel 80% atau lebih. Selanjutnya, dilakukan inokulasi virus Den-3 ke sel BHK₂₁ clone₁₃ dalam keadaan steril (sebelumnya media dari biakan diganti dengan media baru). Dosis yang diberikan sebesar 1 M.O.I atau 300 μ l. Tahap akhir adalah menginkubasi kembali sel yang telah diinokulasi ke dalam inkubator CO₂ 5%, temperatur 37⁰ C.

3.3.3. Memanen virus Den- 3 dalam BHK₂₁ clone₁₃

Pemanenan virus dilakukan pada waktu yang telah ditentukan yaitu : 2, 6, 12, 24, 48 dan 72 jam pasca inokulasi virus. Langkah pertama yang dilakukan adalah membuang media dari biakan, dilanjutkan dengan menambahkan 0.8 ml Trypsin 0.25% dan 1 ml media MEM, kemudian menempatkan suspensi tadi ke dalam eppendorf tube 1.8 ml. Untuk mendapatkan pelet, langkah berikutnya adalah memusingkan suspensi dengan kecepatan 1500 sampai 2000 rpm selama 10 menit. Akhir dari proses ini adalah membuang supernatannya dan menginkubasi pelet ke dalam freezer bersuhu -70⁰ C.

3.3.4. Membuat sel lysat

Melakukan *thawing* pelet yang disimpan pada suhu -70°C terlebih dahulu, kemudian dilanjutkan dengan memusingkan pelet dengan kecepatan 5000 rpm selama 10 menit. Langkah berikutnya adalah membuang supernatan dan menambahkan NP 40 0.5% sebanyak 100 μl , dilanjutkan memusingkan kembali dengan kecepatan 5000 rpm selama 10 menit. Langkah akhir adalah membuang supernatan sampai habis dan menginkubasi sel lysat dalam suhu -70°C .

3.3.5. SDS PAGE (*Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrilamide Gels Electrophoresis*)

SDS merupakan suatu detergen anion natrium dodesil sulfat yang digunakan untuk melarutkan virus murni, sedangkan protein penyusunnya dipisahkan dalam pita terpisah sesuai BM (Berat Molekul) dengan elektrophoresis gel poliakrilamid (SDS-PAGE) (Davis *et al.*, 1994).

a. Mencetak *running gel* 12%

Langkah awal dari proses ini adalah mencampurkan bahan-bahan *running gel* sampai homogen, kemudian dengan cepat memasukkannya ke dalam gelas plate yang telah bersekat dan melakukan fiksasi sedemikian rupa agar hasil *running gel* rata. Untuk meratakan bagian atas *running gel* yaitu dengan cara menambahkan butanoi 50% diatas *running gel*, kemudian menginkubasi selama 25 menit pada suhu kamar agar *running gel* memadat. Langkah terakhir adalah membuang butanol 50% dan

mencuci *running gel* dengan elektroforesis buffer yang sudah diencerkan 10 kali, kemudian membersihkan dan mengeringkan *running gel* dengan kertas filter.

b. Mencetak *stacking gel* 12%

Seperti cara mencetak *running gel*, setelah bahan *stacking gel* tercampur menjadi satu dan homogen, kemudian menuangkannya pada cetakan *running gel*, dan memasukkan *comb*. Inkubasi selama 25 menit pada suhu kamar sampai *stacking gel* padat. Langkah akhir yaitu melepaskan *comb* dan membersihkan serta mencuci *stacking gel*.

c. Menyiapkan sampel

Diawali dengan mencampur sel lysat sebanyak 20 μ l dan laemml buffer (indikator warna) sebanyak 20 μ l ke dalam tabung eppendorf yang tutupnya sudah berlubang. Langkah selanjutnya dilakukan denaturasi protein dengan cara memanaskan campuran tersebut pada suhu 100 °C selama 5 menit.

d. Elektrophoresis

Diawali dengan memasang gelas plate pada elektroforesis (sebelumnya sekatnya dilepas) dan memfiksasi gelas plate dengan baik. Langkah berikutnya adalah menuangkan sampel dan Prestained (marker) pada *stacking gel*, kemudian menyalakan elektroforesis (apabila sampel masih berada pada *stacking gel*, voltase dipasang

40 V, 10 mA, apabila sampel telah melewati *stacking gel* voltase dipasang 120 V, 25 mA dan yang perlu diperhatikan jangan sampai ada gelembung udara). Untuk menghentikan elektroforesis harus menunggu sampai sampel turun melewati *running gel*.

Hasil elektroforesis diproses dalam beberapa tahap: tahap pertama mencuci dengan methanol 50% dan asam asetat 7.5% dalam 200 ml aquadest selama 30 menit. Tahap kedua pencucian dengan methanol 5% ditambah asam asetat 7.5% dalam 200 ml aquadest selama 20 menit. Tahap ketiga pencucian dengan glutaraldehyd 10% dalam 200 ml aquadest selama 20 menit. Tahap keempat pencucian dengan aquadest 200 ml selama 30 menit sebanyak 3 kali. Tahap kelima memasukkan pewarna silver selama 15 menit. Tahap keenam pencucian dengan aquadest 200 ml selama 2 menit sebanyak 2 kali. Tahap ketujuh memasukkan cairan pengembang warna band selama kurang lebih 5 menit. Setelah itu pewarnaan dihentikan dengan menambah asam asetat secukupnya. Tahap kedelapan pencucian dengan aquadest 200 ml selama 2 menit sebanyak 2 kali. Tahap terakhir meletakkan gel dalam larutan 10% glyserin dalam 200 ml aquadest agar tidak rusak. Semua tahapan di atas selalu dilakukan di atas shaker dengan kecepatan 0.30 getaran/detik dan diakhiri dengan membuang cairan.

3.3.6. *Western blot*

Western blot adalah suatu analisa yang dapat digunakan untuk mendeteksi secara simultan antibodi terhadap beberapa protein dari virus tertentu. Langkah awal dari analisa ini adalah pemisahan protein dengan SDS-PAGE, kemudian protein-

protein itu dialihkan secara elektroforetik (blotted) ke dalam membran nitroselulosa. Hasil pengalihan protein ke membran nitroselulosa direaksikan dengan antibodi poliklonal dari kelinci (antibodi I) dan konjugat fragmen Ig G α (anti) kelinci berlabel enzim alkalin phosphatase (antibodi II). Untuk menunjukkan protein virus yang dapat berikatan dengan antibodi I dan II dilakukan pewarnaan fast-red (Rantam, 1999).

a. Semi dry electrophoresis

Pertama-tama hasil SDS-PAGE tanpa dilakukan pencucian dan pewarnaan, ditransfer ke membran nitroselulosa. Cara mentransfer dilakukan dalam beberapa tahap. Tahap pertama yaitu dengan cara memotong kertas filter dan membran nitroselulosa sama besar dengan gel, kemudian merendamnya selama kurang lebih 15 menit dalam transfer buffer. Tahap kedua pada anode elektroblotting transfer aparatus diletakkan secara berturut-turut 5 lembar kertas filter, membran nitroselulosa, gel dan 5 lembar kertas filter. Setelah tersusun rapi dan dipastikan sudah tidak terdapat gelembung udara, dilanjutkan dengan memasang katode dan menghubungkannya dengan aliran listrik (dengan Voltage kurang lebih 5 V, 45 mA) selama 60 menit. Tahap akhir mengambil membran nitroselulose dari alat tersebut.

b. Immunoblotting

Diawali dengan memasukkan membran nitroselulosa ke dalam larutan PBS ditambah 1% BSA selama 10 menit pada temperatur ruangan, untuk memblok protein

yang tidak spesifik. Langkah berikutnya memasukkan membran nitroselulosa dalam larutan antibodi I dalam PBS dengan perbandingan 1 : 500 selama 3 jam. Dilanjutkan mencuci membran nitroselulosa dengan larutan PBS dan 0.05% Tween 20 selama 2 menit sebanyak 3 kali. Tahap berikutnya membran nitroselulosa dimasukkan dalam larutan antibodi II (konjugat) dalam PBS dengan perbandingan 1 : 10.000 selama 1 jam. Selanjutnya mencuci membran nitroselulosa dengan larutan PBS dan 0.05% Tween 20 selama 2 menit sebanyak 3 kali. Tahap akhir adalah pewarnaan fast-red, caranya dengan mencampur staining solution dan Naphthol – As – Mx phosphat (substrat) bersamaan dalam kertas saring dengan perbandingan 1 : 1, kemudian mencuci membran nitroselulosa dalam PBS selama kurang lebih 5 sampai 10 menit pada temperatur ruangan. Hasil proses ini sudah dapat untuk menentukan protein yang imunogenik dan spesifik. Semua proses di atas dilakukan di atas alat shaker dengan kecepatan 0.30 getaran/detik dan selalu diakhiri dengan membuang cairan.

BAB IV

HASIL PENELITIAN

4.1. Hasil SDS-PAGE

Untuk mengetahui waktu dan macam protein yang banyak diekspresikan, virus Dengue 3 diinokulasikan pada sel BHK₂₁ clone₁₃, kemudian dianalisis menggunakan metode SDS-PAGE 12% dengan pewarnaan silver. Hasil SDS-PAGE ditunjukkan pada gambar 6. Kolom 1 tampak beberapa protein mulai dapat diamati walaupun jumlahnya masih sedikit. Protein E (Envelope) ditandai dengan adanya pita yang terletak antara 45 – 66 kd dan protein pr-M (premembran) ditandai dengan pita kecil yang terletak antara 21.5 – 31 kd, tampak pada kolom 1. Pada kolom 2, selain protein E dan pr-M yang muncul, protein C (Capsid) yang memiliki berat molekul dibawah 14.5 kd mulai dapat diamati, walaupun pada gambar warna yang tampak masih kurang jelas. Apabila dibandingkan dengan kolom sebelumnya yaitu kolom 1 dan 2, pada kolom 3 macam protein yang dapat diamati semakin banyak, yaitu mulai tampak jelas pita-pita yang terletak antara 14.5 – 21.5 kd dan 31 – 45 kd. Kolom 3 ini pita-pita untuk protein E, C dan pr-M semakin tampak jelas diikuti dengan intensitas warna yang makin kuat. Keadaan itu tampak semakin jelas dalam kolom 4, di mana pada gambar tampak protein–protein diekspresikan secara optimal oleh virus Dengue 3, terutama untuk protein E, C dan pr-M. Pada kolom 5 dan 6 macam protein yang

dihasilkan masih tetap seperti pada kolom sebelumnya, hanya saja terdapat perbedaan pada intensitas warna.

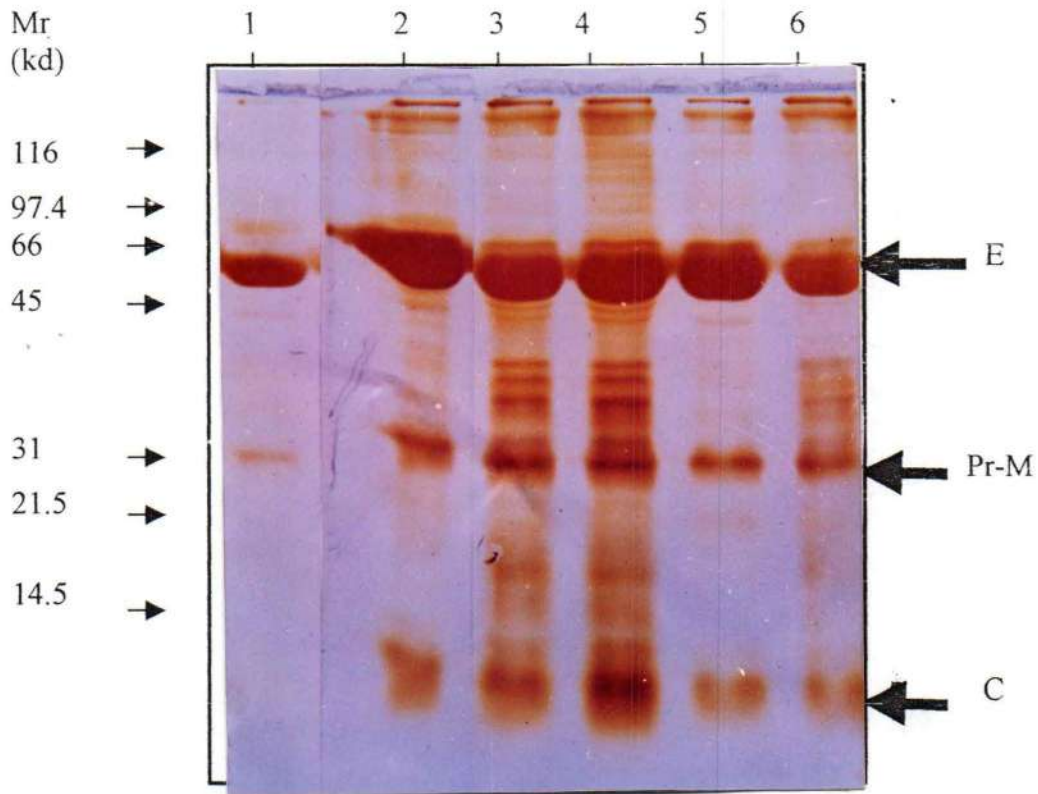
Berdasar hasil tersebut, protein yang banyak diekspresikan oleh virus Dengue 3 adalah protein E, C dan pr-M. Ketiga protein tersebut secara optimal diekspresikan pada inkubasi antara 24 - 72 jam pasca inokulasi virus Dengue 3 dalam sel BHK₂₁ clone₁₃, sedangkan untuk protein E dan pr-M sudah mulai diekspresikan pada inkubasi 2 jam pasca inokulasi.

4.2. Hasil *Western blot*

Setelah mengetahui bahwa protein E, C dan pr-M banyak diekspresikan oleh virus Dengue 3, penelitian dilanjutkan dengan mencari protein yang imunogenik dan spesifik terhadap virus Dengue 3 isolat Indonesia dengan menggunakan metode *Western blot*. Analisis ini, hasil SDS-PAGE dialihkan pada membrane nitroselulosa kemudian direaksikan dengan antibodi poliklonal serum dari kelinci yang telah diinokulasi dengan virus Den-3 sebanyak 1 M.O.I dan berikutnya ditambahkan Ig G α (anti) kelinci berlabel enzim alkalin phosphatase (konjugat). Untuk menunjukkan ikatan tersebut dilakukan pewarnaan fast-red. Hasil *Western blot* didapatkan seperti yang tampak pada gambar 7. Dalam analisis ini protein yang muncul pada membran nitroselulosa merupakan protein yang imunogenik dan spesifik terhadap virus Dengue 3. Kolom 1, protein yang tampak berikatan dengan antibodi I dan II adalah protein E dan pr-M. Kolom 2, selain protein E dan pr-M, protein C juga tampak berikatan

dengan antibodi, sedangkan pada kolom 3 , 4 dan 5 protein C tidak begitu jelas penampakan pitanya. Berbeda dengan pita-pita dari protein E dan pr-M yang penampakannya masih dapat diamati dengan jelas pada gambar, pada kolom 6 protein C kembali tampak jelas, begitu juga dengan protein E dan pr-M.

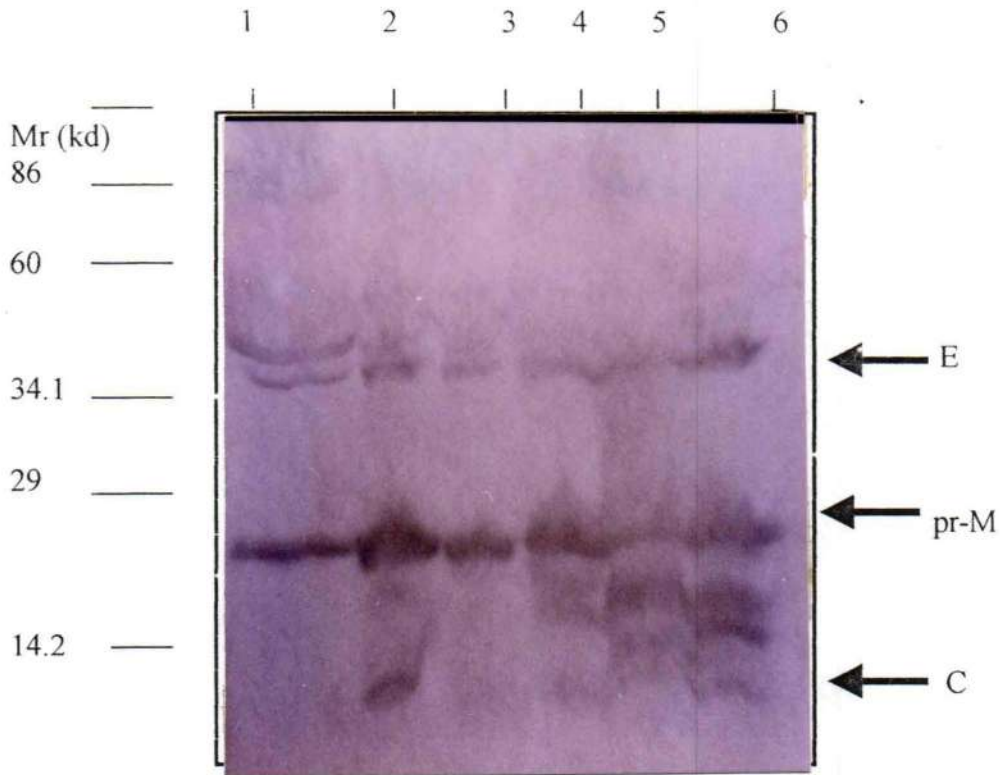
Berdasarkan hasil di atas, protein E, C dan pr-M merupakan protein yang imunogenik dan spesifik terhadap virus Dengue 3, walaupun protein C kurang begitu memberikan hasil yang memuaskan.



Gambar 6. Hasil SDS PAGE 12% dengan pewarnaan silver dari virus Den-3 yang sebelumnya diinokulasikan pada sel BHK₂₁ clone 13 sebanyak 1 M.O.I.

Keterangan :

- Kolom 1 inkubasi 2 jam pasca inokulasi
- Kolom 2 inkubasi 6 jam pasca inokulasi
- Kolom 3 inkubasi 12 jam pasca inokulasi
- Kolom 4 inkubasi 24 jam pasca inokulasi
- Kolom 5 inkubasi 48 jam pasca inokulasi
- Kolom 6 inkubasi 72 jam pasca inokulasi



Gambar 7. Hasil Western blot dengan pewarnaan fast-red dari virus Den-3 yang direaksikan dengan serum dari kelinci (1 : 500) yang sebelumnya diinokulasi dengan virus Den-3 sebanyak 1 M.O.I. dan fragment Ig G α (anti) kelinci (1 : 10.000).

Keterangan :

- Kolom 1 inkubasi 2 jam pasca inokulasi
- Kolom 2 inkubasi 6 jam pasca inokulasi
- Kolom 3 inkubasi 12 jam pasca inokulasi
- Kolom 4 inkubasi 24 jam pasca inokulasi
- Kolom 5 inkubasi 48 jam pasca inokulasi
- Kolom 6 inkubasi 72 jam pasca inokulasi

BAB V

PEMBAHASAN

Mengetahui karakterisasi protein virus Dengue 3 isolat Indonesia sangat penting untuk menemukan macam protein imunogenik yang nantinya dapat digunakan dalam membuat vaksin sub unit, yaitu vaksin yang mengandung protein virus yang dapat menimbulkan antibodi protektif. Vaksin sub unit ini diharapkan dapat digunakan untuk memberikan kekebalan seseorang terhadap penyakit DBD.

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa protein virus Dengue 3 isolat Indonesia yang potensial untuk dijadikan kandidat vaksin sub unit adalah protein E, C dan protein pr-M. Protein tersebut diekspresikan secara optimal antara 24 –72 jam setelah virus Dengue 3 diinokulasikan pada sel BHK₂₁ clone₁₃.

Protein pr-M, C dan protein E adalah protein struktural dari virion. Peran penting dari golongan protein struktural adalah memberi lapisan pelindung bagi asam amino virus. Protein struktural lain yang termasuk ligan, digunakan untuk pelekatan molekul reseptor sel (Fenner *et al.*, 1993). Berdasarkan hal tersebut di atas, protein E, C dan protein pr-M memiliki fungsi yang tidak jauh berbeda. Fungsi protein E adalah bertugas melekatkan virus ke membran sel (Marianneau *et al.*, 1996). Penetrasi virus ke dalam sel, menyebabkan hambatan hemaglutinasi, melindungi maturasi virus dan menyebabkan netralisasi (Gollins dan Portfield, 1985; Guirakhoo *et al.*, 1991). Protein E merupakan protein utama yang menyusun amplop dari virion (Marianneau

et al., 1996). Protein C memiliki fungsi yang utama sebagai penyusun nukleokapsid dari virion (Rice, 1996). Protein C secara langsung kurang mempengaruhi proses penginfeksi virus ke sel. Protein pr-M sendiri merupakan suatu prekursor glikosilat dari struktur protein M (Rice, 1996). Protein M terbentuk setelah protein pr-M mengalami maturasi, dalam waktu singkat sebelum atau bersamaan dengan pelepasan virion, protein pr-M pecah dan terbentuk protein M dan N-terminal pr segmen (Chambers *et al.*, 1991). Tidak semua pr-M yang mengalami maturasi akan pecah menjadi protein M (Rice, 1996), karena pr-M juga memiliki peran sebagai pelindung protein E pada proses maturasi virion di dalam *acidic vesicles* pada proses eksotoksis (Randolph *et al.*, 1990; Guirakhoo *et al.*, 1992). Keadaan itu dapat dilihat pada gambar 3 yang dikutip dari Chambers *et al.* (1991), bahwa pada intraseluler dan ekstraseluler protein pr-M masih tetap tampak. Protein pr-M dan protein E memiliki peranan dalam proses translasi dari retikulum endoplasma ke membran sel (Ruiz-Linores *et al.*, 1989; Despres *et al.*, 1990). Hal terpenting pada protein pr-M ini adalah netralisasi yang dilepaskan virion mengandung pr-M, sehingga secara tidak langsung protein pr-M berperan sebagai antibodi (Rice, 1996). Jadi ketiga protein tersebut yaitu: E, C dan pr-M hanya protein C yang tidak mempunyai fungsi netralisasi, sehingga protein C kurang dapat menginduksi secara spesifik antibodi protektif.

Pada analisa secara *Western blot* menunjukkan bahwa antibodi dari kelinci yang telah diinokulasi dengan virus Dengue 3, dapat berikatan dengan protein pr-M, C dan protein E. Proses terbentuknya antibodi pada tubuh kelinci adalah segera

setelah infeksi, beberapa partikel virus difagositosis oleh makrofag kemudian akan dihancurkan. Protein virus diuraikan menjadi peptida yang lebih pendek dan disajikan pada permukaan makrofag dalam kaitannya dengan protein MHC (*Major Histocompatibility Complex*) kelas II. Kombinasi ini dapat dikenali oleh limfosit CD4⁺ Th₁ (*helper T cell*) memberikan respon melalui proliferasi limfosit T, kemudian melepaskan limfokin yang menarik monosit darah ke tempatnya, selanjutnya merangsang untuk berproliferasi dan berdiferensiasi menjadi makrofag yang aktif. Hal ini merupakan dasar dari respon peradangan. Limfosit Th₂ memberikan respon dengan mengeluarkan sejumlah limfokin yang berbeda untuk membantu sel B, kemudian berikatan dengan virus, membelah dan berdiferensiasi menjadi sel plasma. Sel plasma inilah yang nantinya mengeluarkan antibodi spesifik. Sel Tc (*cytotoxic T cell*) diaktifkan setelah pengenalan peptida virus dalam kaitannya dengan MHC kelas I pada permukaan dari sel yang terinfeksi (Fenner *et al.*, 1993). Jadi dalam serum kelinci dihasilkan antibodi spesifik terhadap protein E, C dan protein pr-M. Ketiga protein tersebut, protein E, pr-M yang lebih imunogenik dibanding dengan protein C. Hal ini disebabkan protein E dan protein pr-M merupakan protein penyusun amplop dari virion, terutama protein E (Rice, 1996) serta memiliki fungsi netralisasi, sehingga karena adanya kedua protein struktural inilah proses penginfeksi virus ke sel dapat berjalan dan antibodi spesifik dibentuk oleh sel B. Antibodi spesifik yang dibentuk oleh sel B dapat berikatan dengan tiap epitop pada protein permukaan dari virion, tetapi hanya antibodi beraviditas cukup tinggi yang dapat berikatan dengan epitop pada protein kapsid luar atau amplop virion, dan mampu menetralkan

infektifitas virus (Fenner *et al.*, 1993). Protein E memiliki susunan nukleotida primer: 792 sampai 812, 892 sampai 923, 1119 sampai 1138, 1582 sampai 1600, 1831 sampai 1847 dan 2088 sampai 2107), protein C memiliki susunan nukleotida primer 616 sampai 632, dan protein pr-M memiliki nukleotida primer 1 sampai 21. Protein E ditunjukkan memiliki tiga antigenik domain (Mandl *et al.*, 1989) yang berperan sebagai reseptor dari virus dan juga dibantu oleh protein pr-M. Protein E dan pr-M dapat disebut protein kunci, karena protein tersebut biasanya mengandung ligan dan berikatan antara reseptor virus dan reseptor sel (Fenner *et al.*, 1993).

Hasil dari penelitian ini sedikit berbeda dengan hasil penelitian yang dilakukan oleh Staropoli *et. al* (1997) untuk virus Dengue serotipe 1 dan Despres *et.al* (1990) untuk virus Dengue serotipe 2. Pada virus Dengue serotipe 1 menghasilkan protein yang spesifik terhadap virus Dengue 1, yaitu E, NS₁ dan pr-M. Virus Dengue serotipe 2, protein E dan pr-M adalah protein yang mampu berikatan dengan antibodi dari tikus yang diinokulasi dengan virus Dengue serotipe 2. Protein non struktural yang berikatan dengan virion utamanya adalah enzim, sebagian besar terlibat dalam transkripsi asam amino, pengaturan, penggolongan atau replikasi (Fenner *et al.*, 1993). Protein NS₁ merupakan protein non struktural yang berperan untuk sintesis virus, perakitan dan pelepasan virion. Protein NS₁ dapat mempengaruhi virulensi dan juga berperan dalam pembentukan kekebalan tubuh. Perlindungan ini melalui antibodi (Rice, 1996). Pada dasarnya, sepuluh macam protein yang dimiliki oleh virus Dengue berperan dengan fungsinya masing-masing dalam proses penginfeksi virus ke sel (Chambers *et al.*, 1991), hanya saja setiap serotipe dari virus Dengue memiliki

memiliki perbedaan genetik pada struktur asam amino. Misalnya pada deretan asam amino untuk protein pr-M, M dan E pada Den-1, 2, 3 dan 4 terdapat perbedaan secara genetik (Lee *et al.*, 1993), sehingga pembentukan antibodi spesifik setiap serotipe akan menjadi berbeda, karena untuk menentukan spesifitas antibodi ditentukan pada urutan asam amino yang terdiri dari tempat pertautan dan antigenik.

Protein E dan protein pr-M ini mulai diekspresikan setelah dua jam virus diinokulasikan pada sel BHK₂₁ clone₁₃, walaupun pengekspresian protein belum banyak, tetapi macam protein yang tampak sudah dapat diamati. Pada inokulasi dua jam ini tampak ada beberapa protein yang dapat diamati, padahal masa eklips dari virus Dengue sendiri sekitar tiga jam (Fenner *et al.*, 1993), maka dapat diperkirakan protein E dan pr-M yang diekspresikan oleh virus berasal dari retikulum endoplasma, sehingga protein yang diekspresikan belum banyak. Pada inkubasi 6 sampai 72 jam, tampak pelepasan virus dan pengekspresian protein semakin banyak, terutama pada inkubasi antara 24 - 72 jam pasca inokulasi, protein diekspresikan secara optimal oleh virus Dengue 3.

BAB VI

KESIMPULAN DAN SARAN

6.1. KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian dapat ditarik kesimpulan sebagai berikut:

1. Protein E (Envelope), protein C (Capsid) dan protein pr-M (premembran) adalah protein imunogenik terhadap virus Dengue 3 isolat Indonesia.
2. Protein E, protein C dan protein pr-M diekspresikan secara optimal antara 24 – 72 jam setelah virus diinokulasi ke sel BHK₂₁ clone 13.

6.2. SARAN

Berdasarkan hasil penelitian secara invitro, perlu dilakukan penelitian secara invivo untuk melengkapi data sebelumnya, bahwa protein E, C dan pr-M spesifik dan protektif terhadap virus Dengue 3 isolat Indonesia.

RINGKASAN

Kartika Hatmisari. Karakterisasi protein imunogenik virus Dengue 3 isolat Indonesia, dibawah bimbingan Bapak Dr. Fedik Abdul Rantam, Drh selaku dosen pembimbing pertama dan Bapak Dr. Hario Puntodewo S., M AppSc, Drh selaku dosen pembimbing kedua.

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui karakter protein imunogenik, yang nantinya dapat menjadi kandidat vaksin Dengue isolat Indonesia.

Virus Dengue 3 isolat Indonesia diinokulasikan pada sel BHK₂₁ clone₁₃ (*Baby Hamsters Kidney*) sebanyak 1 M.O.I (*Multiplicity Of Infection*) yang ditumbuhkan dalam medium MEM (*Minimum Essential Medium*) pada suhu 37⁰ C. Pengumpulan sampel dilakukan dengan cara memberi selang waktu pada inkubasi didalam inkubator CO₂ 5% yaitu 2, 6, 12, 24, 48 dan 72 jam pasca inokulasi, yang bertujuan untuk melihat kapan protein imunogenik diekspresikan. Masing-masing sampel dibuat menjadi sel lysat agar protein virus keluar dari sel, kemudian dianalisis menggunakan metoda SDS-PAGE 12% dengan pewarnaan silver, untuk menentukan macam protein dari virus Dengue 3 berdasarkan berat molekulnya. Analisis selanjutnya adalah *Western blot* dengan pewarnaan fast-red, untuk mengetahui protein imunogenik terhadap virus Dengue 3.

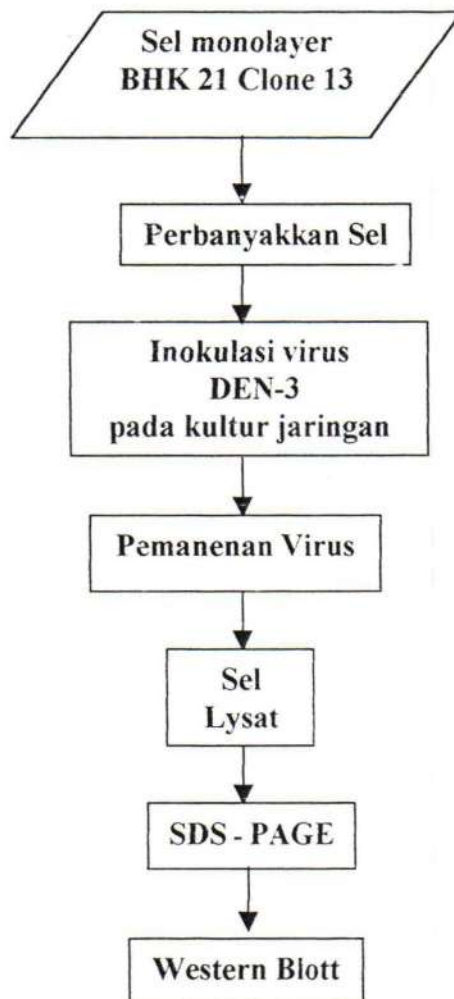
Hasil penelitian menunjukkan bahwa protein E (Envelope), C (Capsid) dan protein pr-M (premembran) merupakan protein imunogenik terhadap virus Dengue 3. Ketiga protein tersebut diekspresikan secara optimal antara 24 - 72 jam pasca inokulasi.

DAFTAR PUSTAKA

- Achmad, H. 1998. Mengapa kasus demam berdarah dengue di Indonesia, khususnya di wilayah DKI Jakarta pada tahun 1998 meningkat ? *Warta demam berdarah dengue*. No. 8. Th. 2
- Anonimus, 1997. *Dengue haemorrhagic fever : Diagnosis, treatment and control*, Geneva. World health organisation. P – 1
- Chambers, T. J, A. Grakoul. and C.Rice. 1991. Flavivirus genome organization, expression and replication. *Annu. Rev. Microbiol.* 649 – 688
- Davis, L., M. Kuehl. and J. Battey. 1994. *Basic methode in molecular biology*. 2nd edition. 616 – 689. Appleton and lange
- Despres, P., A. Ruiz – Linares., M. Girard., C. Wychowski And M.Bouloy. 1990. The 15 amino acid residues preceding the amino terminus of the envelope protein in the yellow fever virus polyprotein precursor act as a signal peptide. *Virus Res.* 59 – 76
- Fenner, F. J., E. J. Gibbs., F. A. Murphy., R. Roll., M.J. Studdert. and D. O. White. 1993. *Virologi veteriner*. Edisi kedua. Academic press, inc
- Gollins, S.W. and J.S. Portfield. 1985. Flavivirus infection: enhancement In macrophages; an electron microscopis study of viral cellular entry. *J. Gen. Viral.* 469 – 473
- Guirakhoo, F., F.X. Heinz., C.W. Mandl., H.Holzmann. and C.Kunz. 1991. Fusion activity of flavivirus; Comparison of mature and immature (pr-M-containing) tick-borne encephalitis virions. *J. Gen. Viral.* 1323 – 1329
- Guirakhoo, F., R.A. Bolin. and J.T. Roehrig. 1992. The Murray Valley encephalitis virus pr-M protein confers acid resistance to virus particles and alters the expression of epitopes within the R2 domain of E glycoprotein. *Virology.* 921 – 931
- Henchal, E.A. and R.J. Putnak. 1990. The dengue viruses. *Clin microbial. Rev* 3. 376 – 396
- Kurane, I and F.E. Ennis. 1992. Immunity and immunopathology in dengue virus infections. *Seminars in immunology.* 4 : 121 – 127

- Lee, E., O.J. Gubler., R.C. Weir. and L. Dalgarno. 1993. Genetic and biological differentiation of dengue 3 isolates obtained from clinical cases in Java, Indonesia, 1976 – 1978. *Archives of virology*. 113 – 125
- Mandl, C.W.; F. Guirakhoo., H. Holzmann., F.X. Heiz. and C.Kunz. 1989. Antigenic structur of the flavivirus envelope protein E at the molecular level, using the tick-borne encephalitis virus as a model. *J. Viral*. 564 – 571
- Marianneau, P., F. Megret., R. Olivier., D.M. Morens. and V.Doubel. 1996. Dengue 1 virus binding to human hepatoma Hep G2 and Simian Vero Cell Surfaces differs. *J. Gen. Viral*. 2547 – 2554
- Ng, M.L., S.Y. Sethoe. and A.E. Ling. 1996. Immune responses of dengue virus infected human sera. Seminar in dengue haemorrhagic fever at Singapore
- Randolph, V.B.,G. Winkler. and V.Stollar. 1990. Acidotropic amines inhibit protealytic processing flavivirus pr-M protein. *Virology*. 450 – 458
- Rantam, F.A. 1998. Aspek virologi demam berdarah dengue. Seminar demam berdarah dengue. TDC Universitas Airlangga. 19 September 1998. 23 – 32
- Rantam, F.A. 1999. Characterization of protein p40 Borna virus infected oligodendritis cells. *J. Indonesia tropical medicine*. Vol 9. No 1. 23 – 30
- Rice, C.M. 1996. *Flaviviridae : The viruses and their replication*. Fieldy virology. Third Edition. 931 – 942
- Ruiz – Linores, A., A. Cahour., P. Despres., M. Girard. and M. Boulay. 1989. Processing of yellow fever virus polyprotein : role of cellular proteases in the maturation of the structural proteins. *J.Viral*. 4199 – 4209
- Sabin, A.B. 1986. *Dengue in viral and Rickettsia Infection of man*. Edited by Rivers. Norsfall. 3rd edition. 361 – 374. J. B. Lippincott Company Philadelphia Montreal
- Soewando, E.S. 1997. Demam berdarah dengue pada orang dewasa gejala klinik dan penatalaksanaannya. *Folia medica Indonesiana*. Vol 33. 38 – 42
- Soewando, E.S. 1998. Gejala klinik dan penatalaksanaannya. Seminar demam berdarah dengue. TDC Universitas Airlangga. 19 September 1998. 52 – 57

- Staropoli, I., M.P. Frenkiel., F. Megret. And V. Deubel. 1997. Affinity-purified dengue-2 virus envelope glycoprotein induces neutralizing antibodies and protective immunity in mice. *Vaccine*. Vol 15. 1 – 9
- Sumarmo. 1987. Demam berdarah dengue pada anak. UI – Press
- Swctie, V. 1987. Immunological aspects of dengue haemorrhagic fever : studies in Thailand southeast asian. *J. Trop med pub health*. 18 – 312

Lampiran 1**Bagan alir Penelitian Sel Monolayer BHK 21 Clone 13**

Lampiran 2.

Komposisi bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian :

1. Komposisi Media *Minimum Essential Medium* (MEM)

| Metabolik Substrat | m mol dm⁻³ |
|---------------------------|------------------------------|
| Arginin | 0.6 |
| Cystin | 0.1 |
| Glutamin | 2.0 |
| Histidin | 0.2 |
| Isoleusin | 0.4 |
| Leusin | 0.4 |
| Methyonin | 0.1 |
| Lysin | 0.4 |
| Phenyalanin | 0.2 |
| Threonin | 0.4 |
| Tryptofan | 0.05 |
| Tyrosin | 0.2 |
| Valin | 0.4 |
| Glucosa | 5.5 |

Vitamin

| | |
|-------------|------|
| Choline | 8.3 |
| Folic Acid | 2.3 |
| Inosital | 11.0 |
| Nikotinamid | 8.2 |
| Panthotenat | 4.6 |
| Pyridoxal | 6.0 |
| Riboflavin | 0.27 |
| Thiamin | 3.0 |

Garam-garam Anorganik

| | |
|--------------------------------------|-----|
| NaCl | 116 |
| KCl | 5.4 |
| CaCl | 1.8 |
| MgCl ₂ .6H ₂ O | 1.0 |

| | |
|---|------|
| NaH ₂ PO ₄ .2H ₂ O | 1.1 |
| NaHCO ₃ | 23.8 |

2. Komposisi *Phosphat Buffer Saline* (PBS)

| | | |
|--|---------|-------------|
| NaCl | 137 | mM (8.0 g) |
| KCl | 2.70 | mM (0.2 g) |
| Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O | 8.0 | mM (1.42 g) |
| KH ₂ PO ₄ | 1.8 | mM (0.24 g) |
| Aquadest | ad 1000 | ml |

3. Komposisi *Trypsin 0.25%*

| | |
|---------|--------|
| PBS | 100 ml |
| Trypsin | 0.5 g |
| EDTA | 0.07 g |

4. Komposisi *Running Gel 12%*

| | |
|------------------|--------|
| Acrylamid | 2.5 ml |
| Tris- HCl pH 8.8 | 1.2 ml |
| SDS 0.5% | 1.2 ml |
| Aquadest | 1.1 ml |
| Temed | 5.0 µl |
| APS 10% | 30 µl |

5. Komposisi *Stacking Gel 12%*

| | |
|------------------|--------|
| Acrylamid | 0.66ml |
| Tris-HCl pH 6.8 | 0.8 ml |
| SDS 0.5% | 0.8 ml |
| H ₂ O | 0.74ml |
| Temed | 4.0 µl |
| APS 10% | 20 µl |

6. Komposisi *NP 40 0.5%*

| | |
|----------|--------|
| Aquadest | 50 ml |
| NP 40 | 250µl |
| NaCl | 1.45mg |

7. Komposisi pewarna silver

| | |
|--|--------|
| Aquadest | 147ml |
| NaOH 0.36% | 42 ml |
| NH ₃ 25% | 2.8 ml |
| AgNO ₃ dilarutkan dalam 8 ml Aquadest | 1.6 g |

8. Komposisi pengembang warna

| | |
|-----------------|-------|
| Aquadest | 200ml |
| Formaldehid 37% | 100µl |
| Asam Citrat 5% | 200µl |

9. Komposisi Transfer Buffer

| | |
|----------------------------------|-----------|
| Tris (hydroxymethyl) aminomethan | 15.15g |
| Glycin | 72.00g |
| Methanol (pA) | 1000ml |
| Aquadest | ad 5000ml |

10. Komposisi Electrophoresis Buffer

| | |
|---|-----------|
| Tris (hydroxymethyl) aminomethan | 30.29g |
| Glycin | 144.13g |
| SDS CH ₁₂ H ₂ SO ₄ | 10 g |
| Aquadest | ad 1000ml |

11. Komposisi *Bovine Serum Albumin (BSA)* 1%

| | |
|--------------------------------------|--------|
| BSA (dilarutkan dalam 4 ml aquadest) | 4 g |
| Aquadest | 100 ml |

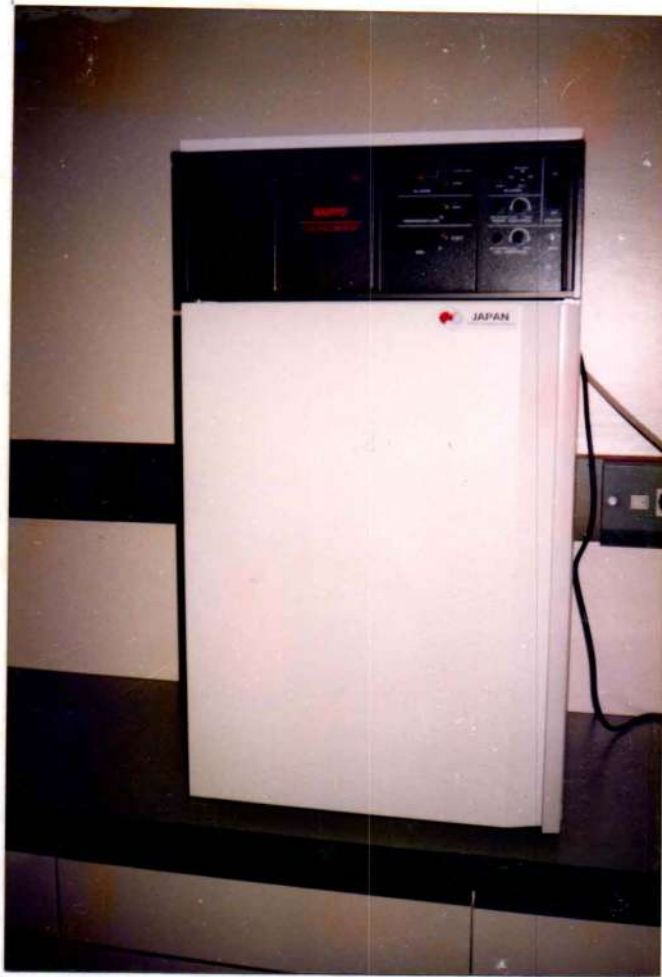
12. Komposisi Fast-red

| | | |
|--------------------------|--|----------------|
| Buffer untuk pewarnaan | 200mM Tris HCl pH 8.0 | 15.75g/ 500 ml |
| | 2mM MgCl ₂ | 0.203g/ 500ml |
| Solutio Straining | fast-red dalam Tris Buffer | 12 mg/ ml |
| Substrat untuk pewarnaan | β-naphthol As- mx phosphat dlm H ₂ O destilan | 0.8 mg/ml |
| Aquadest | 500 ml | |

Lampiran 3. Beberapa peralatan yang digunakan dalam penelitian



Laminar Flow Hood



Inkubator CO₂



a. Peralatan untuk SDS PAGE dan Western Blot



b. Shaker