

**PURIFIKASI ANTIBODI POLIKLONAL SEBAGAI REAGENSIA
SANDWICH ELISA PENDETEKSI PROTEIN P24 HUMAN
IMMUNODEFICIENCY VIRUS-1 (HIV-1)**

TESIS

Diajukan untuk Memperoleh Gelar Magister Biomedik

DEKA LARASATI

0606 000 043



**UNIVERSITAS INDONESIA
FAKULTAS KEDOKTERAN
PROGRAM STUDI ILMU BIOMEDIK
KEKHUSUSAN IMUNOLOGI**

JAKARTA

2009

HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS

Tesis ini adalah hasil karya saya sendiri, dan semua sumber baik yang dikutip maupun dirujuk telah saya nyatakan dengan benar.

Nama : Deka Larasati

NPM : 0606000043

Tanda tangan

A handwritten signature in black ink is written over a rectangular stamp. The stamp contains the text '600' in large digits, 'Tel.' followed by a small number, and 'METRO' at the bottom. The signature is written in a cursive style.

Tanggal : 18 Juni 2009

HALAMAN PENGESAHAN

Tesis ini diajukan oleh :

Nama : Deka Larasati

NPM : 0606 000 043

Program Studi : Ilmu Biomedik

Judul Tesis : **Purifikasi Antibodi Poliklonal sebagai Reagensia Sandwich ELISA Pendeteksi Protein P24 Human Immunodeficiency Virus-1 (HIV-1)**

Telah berhasil dipertahankan di hadapan Dewan Penguji dan diterima sebagai bagian persyaratan yang diperlukan untuk meraih gelar sarjana Master Biomedik pada Program Studi Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia.

DEWAN PENGUJI

Pembimbing : dr. Budiman Bela, Sp.MK (.....)

Pembimbing : dr. Fera Ibrahim, MSc, PhD., Sp.MK (.....)

Penguji : DR. drs.Heri Wibowo, M.S. (.....)

Penguji : dr. Ani Retno, M.S. (.....)

Penguji : Andi Yasmon, S.Pi., M.Biomed. (.....)

Ditetapkan di : Jakarta

Tanggal : 18 Juni 2009

Ketua Program Studi Magister Ilmu Biomedik :

Dr. rer. physiol. dr. Septelia Inawati W. (.....)

KATA PENGANTAR

Puji syukur saya panjatkan kepada Allah SWT, karena atas segala berkat dan kasih karunia-Nya, saya dapat menyelesaikan tesis ini. Penulisan tesis ini dilakukan dalam rangka memenuhi salah satu syarat untuk mencapai gelar Magister Biomedik Program Studi Ilmu Biomedik pada Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia. Saya menyadari banyak pihak yang telah membantu penyelesaian tesis ini. Oleh karena itu saya mengucapkan terima kasih kepada:

1. dr. Budiman Bela, Sp.MK selaku Pembimbing I dan dr. Fera Ibrahim, M.Sc., Ph.D, Sp.MK, selaku Pembimbing II yang telah menyediakan waktu, tenaga, pikiran dan nasehat untuk mengarahkan saya selama masa studi dan dalam penyiapan penelitian sampai penyusunan tesis ini;
2. Dr. rer.physiol. Septelia Inawati Wanandi selaku Ketua Program Studi Ilmu Biomedik, atas kesempatan yang diberikan kepada saya untuk mengikuti pendidikan Program Studi Ilmu Biomedik dan memberi kesempatan kepada saya untuk menyelesaikan pendidikan tepat waktu;
3. dr. Alida Harahap, Ph.D, Sp.PK selaku ketua kekhususan Imunologi FKUI (sampai periode 2008) dan DR. Heri Wibowo selaku ketua kekhususan Imunologi FKUI, atas bimbingan yang telah diberikan;
3. dr. Anis Karuniawati, Ph.D., Sp.MK. selaku ketua Departemen Mikrobiologi FKUI dan, dr. Mardiasuti, M.Sc., Sp.MK (ketua Departemen Mikrobiologi FKUI sampai dengan periode 2008) atas kesempatan yang diberikan kepada saya untuk melaksanakan penelitian di lingkungan Departemen Mikrobiologi FKUI;
4. DR. Rusdi, M.Biomed selaku ketua Jurusan Biologi FMIPA UNJ (sampai periode 2008), Dra. Nurmasari Sartono, M.Biomed selaku ketua Jurusan Biologi FMIPA, Dra. Marheni, MSc. selaku dekan FMIPA UNJ yang telah memberikan kesempatan kepada saya untuk menempuh pendidikan Program Studi Ilmu Biomedik pada Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia;
5. Suami (Lipur Sugiyanta) dan anakku (Yusuf Bagas Rinata) tercinta atas dukungan, doa dan semangat yang diberikan selama ini;

6. Orang tua (Ayahanda Sumana dan Ibunda Demyana) yang telah memberikan dukungan doa, kasih sayang dan semangat kepada saya selama ini; kakak (Mediany Sussi dan Soni Sumarseno), Adik-adik (Khaeri Marifah, Puty Lestari, Andika);
7. Keluarga Bapak dan Ibu Warasa atas doanya;
8. Sahabat-sahabat saya, Fithri, Yuni, Ida, Mbak Ika, Angel, Bu Yus, Febri, teman satu angkatan pada Program Biomedik telah memberikan dukungan doa, semangat dan persahabatan; Teman-teman satu laboratorium di Mikrobiologi FKUI atas dukungan doa, kerjasama dan persahabatan selama ini serta sahabat lainnya yang tidak dapat disebutkan satu persatu, terima kasih atas segala kerjasama, bantuan, nasehat, doa dan persahabatan selama penelitian dan penyusunan tesis ini.
9. Seluruh staf dan pegawai di Departemen Mikrobiologi FKUI dan Laboratorium IHVCB-UI.

Akhir kata, saya berharap Allah SWT berkenan membalas segala kebaikan semua pihak yang telah membantu. Semoga tesis ini membawa manfaat bagi pengembangan ilmu.

Jakarta, 18 Juni 2009

Penulis

HALAMAN PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI
TUGAS AKHIR UNTUK KEPENTINGAN AKADEMIS

Sebagai sivitas akademik Universitas Indonesia, saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Deka Larasati
NPM : 06 06 000 043
Program Studi : Ilmu Biomedik
Departemen : Immunologi
Fakultas : Kedokteran
Jenis Karya : Tesis

demikian pengembangan ilmu pengetahuan, menyetujui untuk memberikan kepada Universitas Indonesia **Hak Bebas Royalti Noneksklusif (*Non-exclusive Royalty-Free Right*)** atas karya ilmiah saya yang berjudul:

Purifikasi Antibodi Poliklonal sebagai Reagensia Sandwich ELISA Pendeteksi Protein P24 Human Immunodeficiency Virus-1 (HIV-1)

Beserta perangkat yang ada (jika diperlukan). Dengan Hak Bebas Royalti Noneksklusif ini Universitas Indonesia berhak menyimpan, mengalihmedia/formatkan, mengelola dalam bentuk pangkalan data (*database*), merawat, dan mempublikasikan tugas akhir saya tanpa meminta izin dari saya selama tetap mencantumkan nama saya sebagai penulis.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya.

Dipuat di: Jakarta
Pada tanggal: 18 Juni 2009
Yang menyatakan,



(Deka Larasati)

ABSTRAK

Penggunaan antibodi poliklonal dalam sistem pendeteksi antigen P24 HIV-1 layak untuk dipertimbangkan mengingat variasi susunan epitop P24 pada berbagai sub tipe HIV-1 berpotensi mengakibatkan kegagalan pengenalan epitop oleh antibodi monoklonal. Antibodi poliklonal yang diperoleh melalui induksi dengan antigen rekombinan berpotensi bereaksi secara non spesifik terhadap protein kontaminan yang terdapat dalam sediaan antigen rekombinan sehingga dapat berpengaruh pada spesifisitas sistem pendeteksi antigen.

Pada penelitian sebelumnya diperoleh informasi mengenai reaksi non spesifik serum anti P24 HIV-1 poliklonal yang dihasilkan melalui imunisasi kelinci, khususnya terhadap antigen *E.coli* dan *Bovine Serum Albumin* (BSA). Oleh karena penelitian ini, maka diteliti efek purifikasi dengan kromatografi afinitas dalam menghilangkan reaktivitas non spesifik antara serum anti P24 dengan *E.coli* dan BSA. Dampak ini dinilai dengan menggunakan teknik sandwich *Enzyme Linked Immunoassay* (ELISA).

Purifikasi dilakukan dengan menggunakan dua kolom kromatografi afinitas dengan ligan *E.coli* pada kolom pertama dan ligan P24 rekombinan HIV-1 pada kolom kedua. *CnBr* -sepharose digunakan sebagai matriks. Proses elusi menggunakan glycine HCl, pH 2,7. Eluen hasil purifikasi dikonfirmasi dengan teknik SDS PAGE, western blot dan sandwich ELISA pendeteksi antigen P24 HIV-1. Pada SDS PAGE terbentuk pita antara berat molekul 45-116 kDa yang menunjukkan pita antibodi. Pada uji western blot terdapat pita spesifik protein P24 rekombinan HIV-1 dan tidak muncul pita non spesifik terhadap *E.coli*. Sedangkan pada uji sandwich ELISA, eluen menunjukkan nilai absorbansi yang lebih tinggi dibandingkan dengan kontrol negatif, dan terdapat penurunan nilai absorbansi dibandingkan dengan sistem tanpa antibodi yang dipurifikasi. Nilai absorbansi eluen juga tidak menunjukkan hasil yang berbeda dengan kontrol negatif jika direaksikan dengan antigen *E.coli*. Namun reaktivitas non spesifik eluen dengan BSA pada sistem sandwich ELISA tidak berbeda dengan reaktivitas serum prepurifikasi. Pada uji western blot dan sandwich ELISA diperoleh pula informasi yang menunjukkan adanya reaksi non spesifik antara antibodi anti-kelinci yang digunakan dengan protein *E.coli*.

Purifikasi antibodi dengan menggunakan metode kromatografi afinitas telah berhasil dilakukan dengan kondisi optimal pemurnian dan telah diperoleh eluen yang mengandung antibodi terhadap P24 rekombinan HIV-1 yang tidak bereaksi dengan protein *E.coli*. Reagensia yang digunakan dalam sistem pendeteksi berpotensi menimbulkan ikatan non spesifik yang dapat mengganggu nilai absorbansi, sehingga sebelum digunakan harus dinilai kelayakannya untuk digunakan dalam sistem diagnostik tertentu.

Kata kunci: purifikasi, antibodi poliklonal, sandwich ELISA

ABSTRACT

Polyclonal antibody may be important to be considered in sandwich ELISA which detected HIV-1 P24 due to the existing variations in P24 epitope structure. Variations in epitope structure has the potential to produce false negative result in serologic diagnostic system that utilize monoclonal antibody. Polyclonal antibody induced by recombinant antigen could exhibit non specific reaction due to the presence of contaminant in antigen preparation that originates from the host used for expression of the recombinant antigen.

In the previous research, we have already known that our polyclonal antibody in P24 HIV recombinant immunized rabbit serum had non specific reaction with E.coli protein and Bovine Serum Albumin (BSA) in sandwich ELISA system for detecting HIV-1 P24 recombinant protein. This was the major reason to purify the antibody with affinity chromatography. Our goal was to reduce the non specific reaction. We used sandwich Enzyme Linked Immunoassay (ELISA) to see the effect of purification.

We used two columns affinity chromatography with different ligand in each column and CnBr sepharose as solid support. The first column utilized E.coli protein as ligand and the second one used HIV-1 P24 recombinant protein. We used glycine HCl, pH 2,7 to elute antibody from affinity chromatography column. Eluen from the second column was confirmed with SDS PAGE, western blot and sandwich ELISA. SDS PAGE followed by comassie blue staining showed specific bands between 45-116 kDa molecular weight, which were interpreted as heavy and light chain fragments of antibody. Purified antibody in the second eluen was shown to be reactive with HIV-1 P24 recombinant protein but not E.coli protein by western blot analysis. There was a decline in the absorbance when eluen was used as detection antibody in sandwich ELISA system, compared with the system that utilized pre purified antibody. We also observed there was non specific reaction between the components in sandwich ELISA for detection of HIV-1 P24 recombinant antigen, in that we found the antibody against anti- rabbit IgG which was used in sandwich ELISA system had non specific reaction with E.coli protein.

We concluded that we gained optimal condition in polyclonal antibody purification to reduce non specific reaction between polyclonal antibody to HIV-1 P24 recombinant antigen with E.coli protein. Reagents which used in our sandwich ELISA system potentially caused non specific reaction so we have to consider their application.

Keyword: Purification, polyclonal antibody, sandwich ELISA

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL.....	i
HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS	ii
LEMBAR PENGESAHAN	iii
KATA PENGANTAR	iv
LEMBAR PERSETUJUAN PUBLIKASI KARYA ILMIAH	vi
ABSTRAK	vii
DAFTAR ISI	ix
DAFTAR GAMBAR	xi
DAFTAR TABEL.....	xiii
DAFTAR SINGKATAN.....	xiv
DAFTAR LAMPIRAN.....	xv
1. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Tujuan Penelitian	3
1.3 Manfaat Penelitian	4
2. TINJAUAN PUSTAKA	5
2.1. <i>Human Immunodeficiency Virus</i>	5
2.1.1. Karakteristik Biologik.....	5
2.1.2. Kinetika Respon Imun pada Infeksi HIV-1.....	8
2.1.3. Pemeriksaan Serologi terhadap HIV	9
2.2. Antigen dan Antibodi.....	12
2.2.1. Antigen.....	12
2.2.2. Antibodi.....	13
2.2.2.1 Purifikasi Antibodi.....	14
2.2.3. Ikatan Antigen Antibodi	18
2.2.3.1. <i>Enzyme Linked Immunoassay (ELISA)</i>	19
3. METODOLOGI PENELITIAN.....	21
3.1. Waktu dan Tempat Penelitian.....	21
3.2. Strategi Penelitian.....	21

3.3. Bahan dan Cara Kerja.....	22
3.3.1. Uji Reaktivitas Serum Kelinci dan Marmut terhadap Protein P24 Rekombinan HIV-1.....	22
3.3.1.1. SDS PAGE dan Western Blot.....	22
3.3.1.2. ELISA.....	22
3.3.2. Identifikasi Ikatan Non Spesifik terhadap Protein <i>E.coli</i> BL21 dan BSA pada Serum Kelinci dan Marmut dengan Sistem Sandwich ELISA Pendeteksi Protein P24 Rekombinan HIV-1.....	24
3.3.2.1. Sandwich ELISA.....	24
3.3.2.2. Preparasi Lisat <i>E.coli</i> BL21.....	25
3.3.3. Purifikasi Antibodi Poliklonal.....	26
3.3.3.1. Purifikasi dengan Menggunakan Kromatografi Afinitas.....	26
3.3.3.1.1. Purifikasi Antibodi Poliklonal dengan Ligan <i>E.coli</i>	26
3.3.3.1.2. Purifikasi Antibodi Poliklonal dengan Ligan P24 Rekombinan HIV-1.....	26
3.3.4. Konfirmasi Antibodi Hasil Purifikasi.....	27
3.3.4.1. SDS PAGE	27
3.3.4.2. ELISA	28
3.3.4.3. Western Blot	28
3.3.5. Penentuan konsentrasi antibodi pendeteksi pasca purifikasi pada sistem sandwich ELISA pendeteksi protein P24 rekombinan HIV-1...29	29
4. HASIL DAN PEMBAHASAN	30
4.1. Uji Reaktivitas Serum Kelinci dan Marmut terhadap Protein P24 Rekombinan HIV-1.....	31
4.2. Identifikasi Ikatan Non Spesifik terhadap Protein <i>E.coli</i> BL21 dan BSA pada Serum Kelinci dan Marmut dengan Sistem Sandwich ELISA Pendeteksi Protein P24 Rekombinan HIV-1.....	32
4.3. Purifikasi Antibodi Poliklonal.....	36
4.4. Konfirmasi Antibodi Hasil Purifikasi.....	37
4.5. Penentuan konsentrasi antibodi pendeteksi pasca purifikasi pada sistem sandwich ELISA pendeteksi protein P24 rekombinan HIV-1...47	47
5. KESIMPULAN DAN SARAN	51
DAFTAR REFERENSI	53
RIWAYAT HIDUP	57
LAMPIRAN	58
ARTIKEL.....	68

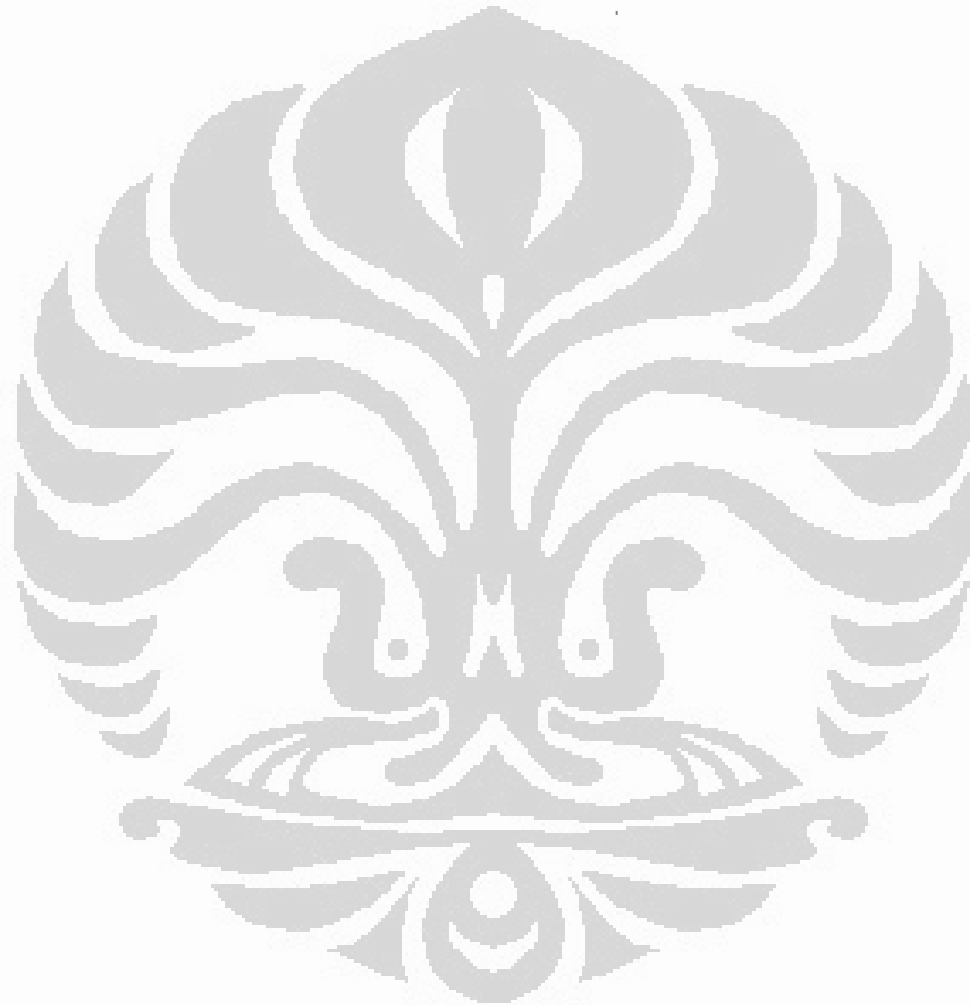
DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1. Genome HIV 1.....	5
Gambar 2.2. Profil serologi infeksi HIV.....	8
Gambar 2.3. Skema strategi pemeriksaan HIV yang direkomendasikan WHO/UNAIDS.....	11
Gambar 3.1. Alur penelitian.....	21
Gambar 4.1. Uji reaktifitas antibodi marmut dan kelinci hasil imunisasi yang diencerkan menjadi konsentrasi 1/5000 dengan antigen P24 rekombinan HIV-1 dengan teknik western blot.....	30
Gambar 4.2. Uji reaktivitas serum kelinci dan marmut dengan antigen P24 rekombinan HIV-1 dengan teknik ELISA.....	31
Gambar 4.3. Uji Sandwich ELISA untuk mencari ikatan non spesifik yang mempengaruhi absorbansinya.....	33
Gambar 4.4. Uji Sandwich ELISA untuk mengetahui perbedaan waktu inkubasi serum kelinci dengan larutan dapar pelarut yang mengandung BSA dengan berbagai konsentrasi.....	35
Gambar 4.5. Uji sandwich ELISA untuk mengetahui pengaruh konsentrasi protein E.coli BL21 dalam pelarut serum kelinci terhadap terbentuknya sinyal yang ditimbulkan dalam sistem tersebut untuk mendeteksi antigen P24 rekombinan HIV-1.....	36
Gambar 4.6. A.Hasil SDS PAGE Flow trough kolom P24 rekombinan HIV-1 dan cucian pertama.....	38
Gambar 4.7. Hasil SDS PAGE eluen kolom P24 rekombinan HIV-1.....	39
Gambar 4.8. Uji western Blot untuk menguji reaktifitas antibodi kelinci dalam eluen pasca purifikasi kolom P24 rekombinan HIV-1 dengan melapisi kertas nitroselulosa dengan antigen P24 rekombinan dan E.coli.....	40
Gambar 4.9. Uji western blot untuk mengetahui reaktifitas eluen pasca purifikasi dengan antigen E.coli BL21.....	41
Gambar 4.10. Uji western blot untuk mengetahui pengaruh gel poliakrilamid dan antibodi anti kelinci terhadap timbulnya pita nonspesifik.....	42
Gambar 4.11. Uji Sandwich ELISA untuk membandingkan nilai absorbansi yang dihasilkan eluen hasil purifikasi menggunakan ligan P24 rekombinan HIV-1 dengan serum kelinci prepurifikasi.....	44

Gambar 4.12 Uji Sandwich ELISA untuk membandingkan nilai absorbansi yang dihasilkan eluen hasil purifikasi menggunakan ligan P24 rekombinan HIV-1 tanpa diencerkan dengan serum kelinci prepurifikasi.....45

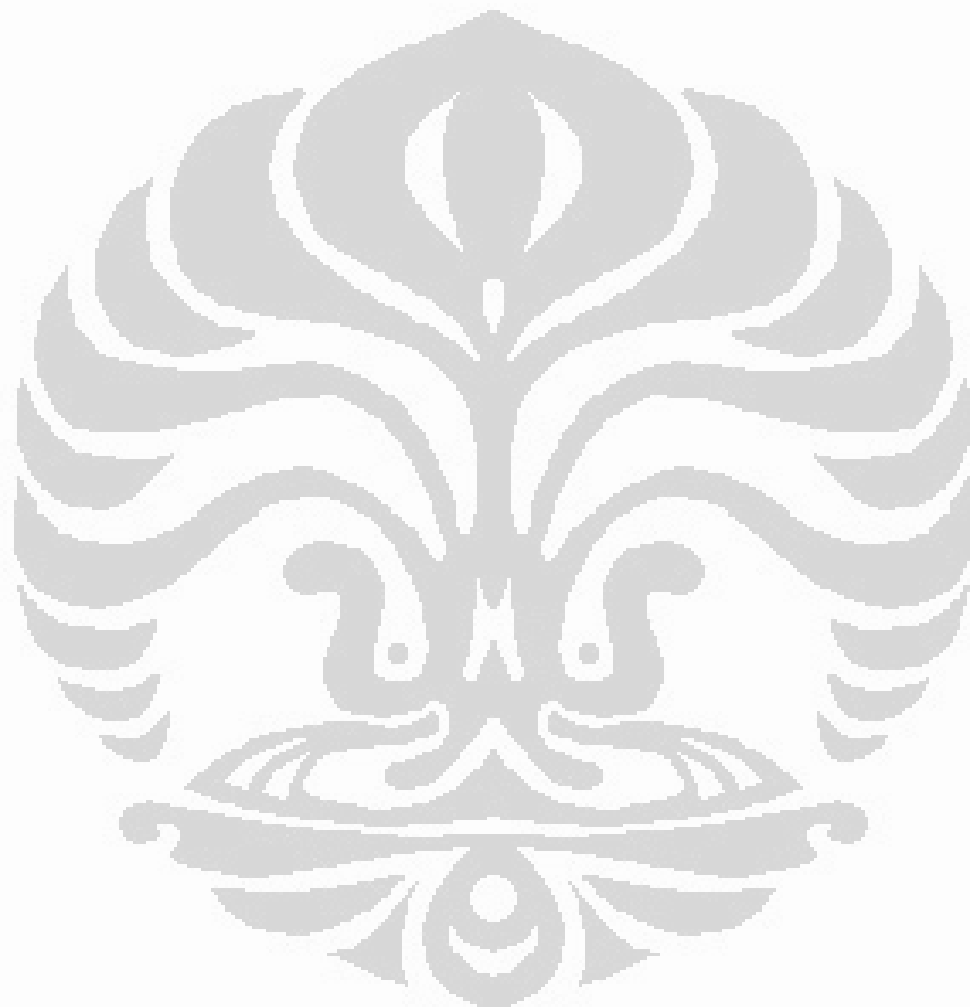
Gambar 4.13. Sistem sandwich ELISA untuk membandingkan sinyal yang dihasilkan serum kelinci pre purifikasi dengan serum kelinci hasil purifikasi kolom P24 rekombinan HIV-1 dan kolom E.coli.....47

Gambar 4.14. Hasil optimasi konsentrasi serum kelinci hasil purifikasi kolom P24 rekombinan HIV-1 dengan sistem sandwich ELISA.....48



DAFTAR TABEL

Tabel 2.1. Protein pada HIV.....	7
Tabel 2.2. Sumber antibodi berasal dan kontaminan yang mungkin ditemui.....	16



DAFTAR SINGKATAN

μL	Mikroliter
Ab	Antibodi
Ag	Antigen
AIDS	<i>Acquired Immunodeficiency Syndrome</i>
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i>
CnBr	<i>Cyanogen Bromide</i>
DAB	<i>Diamino Benzidine</i>
DTT	Dithiotreitol
E.coli	<i>Escherichia coli</i>
ELISA	<i>Enzyme Linked Immunoassay</i>
Fab	Fragmen variabel struktur antibodi
Fc	Fragmen konstan struktur antibodi
gp	Glikoprotein
HCl	<i>Hydrogen Chloride</i>
HIV	<i>Human Immunodeficiency Virus</i>
Ig	Immunoglobulin
Kd	Konstanta Disosiasi
kDa	Kilo Dalton
M	Molar
mg	Miligram
ml	Mililiter
mM	Milimolar
NaCl	<i>Sodium Chloride</i>
ng	Nanogram
OPD	<i>o-phenylenediamine dihydrochloride</i>
p	Protein
PBS	<i>Phosphate Buffer Saline</i>
pH	Derajat keasaman
rP24	Protein P24 rekombinan
SDS PAGE	<i>Sodium Dodecyl Sulphate Polyacrylamide Gel Electrophoresis</i>
TMB	<i>Tetra Methyl Benzidine</i>

DAFTAR LAMPIRAN

- Lampiran 1. Data nilai absorbansi pada menit kedua puluh pada gambar 4.2. Uji reaktivitas serum kelinci dan marmut dengan antigen P24 rekombinan HIV-1 dengan teknik ELISA.....58
- Lampiran 2. Data nilai absorbansi pada menit kedua puluh pada gambar 4.3. Uji Sandwich ELISA untuk mencari ikatan non spesifik yang mempengaruhi absorbansinya.....59
- Lampiran 3. Data rerata nilai absorbansi menit kedua puluh pada gambar 4.4. Uji Sandwich ELISA untuk mengetahui perbedaan waktu inkubasi serum kelinci dengan larutan dapar pelarut yang mengandung BSA dengan berbagai konsentrasi.....61
- Lampiran 4. Data rerata nilai absorbansi menit kedua puluh pada gambar 4.5. Uji sandwich ELISA untuk mengetahui pengaruh konsentrasi protein E.coli BL21 dalam pelarut serum kelinci terhadap terbentuknya sinyal yang ditimbulkan dalam sistem tersebut untuk mendeteksi antigen P24 rekombinan HIV-1.....61
- Lampiran 5. Data rerata nilai absorbansi menit kedua puluh pada gambar 4.11 (Uji Sandwich ELISA untuk membandingkan nilai absorbansi yang dihasilkan eluen hasil purifikasi menggunakan ligan P24 rekombinan HIV-1 dengan serum kelinci prepurifikasi).....62
- Lampiran 6. Data rerata nilai absorbansi menit kedua puluh pada gambar 4.12 (Uji Sandwich ELISA untuk membandingkan nilai absorbansi yang dihasilkan eluen hasil purifikasi menggunakan ligan P24 rekombinan HIV-1 tanpa diencerkan dengan serum kelinci prepurifikasi).....63
- Lampiran 7. Data rerata nilai absorbansi menit kesepuluh pada gambar 4.13. Sistem sandwich ELISA untuk membandingkan sinyal yang dihasilkan serum kelinci pre purifikasi dengan serum kelinci hasil purifikasi kolom P24 rekombinan HIV-1 dan kolom E.coli. Serum diencerkan sampai dengan konsentrasi 1/50.....64
- Lampiran 8. Data rerata nilai absorbansi menit kedua puluh pada gambar 4.14. Hasil optimasi konsentrasi serum kelinci hasil purifikasi kolom P24 rekombinan HIV-1 dengan sistem sandwich ELISA.....65
- Lampiran 9. Rangkuman Penjelasan Gambar Uji ELISA.....66

BAB 1 PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang Penelitian

Acquired Immunodeficiency Syndrome (AIDS) adalah penyakit yang disebabkan karena infeksi *Human Immunodeficiency Virus* (HIV) yang mempunyai karakteristik menekan sistem imun dan diikuti munculnya infeksi oportunistik, keganasan, atau degenerasi sistem saraf sentral. Virus ini menginfeksi sel-sel yang terlibat dalam sistem pertahanan tubuh, diantaranya T helper, makrofag, dan sel dendritik.¹

Penyebab utama AIDS adalah *Human Immunodeficiency Virus* Tipe I (HIV-1). Virus ini merupakan retrovirus dengan subfamili: Lentivirus. Pada HIV terdapat pula 6 gen tambahan yang berperan dalam infeksi dan ekspresi gen virus tersebut. Gen-gen tersebut diantaranya adalah tat, rev, nef, vif, vpr, dan vpu. Gen-gen tersebut akan diekspresikan dalam bentuk protein.² Protein-protein yang terbentuk mempunyai nama, ukuran, fungsi dan lokasi yang berbeda-beda. Protein utama yang merupakan target antibodi adalah protein env (gp41, gp120, gp160), pol (p66, p31), dan gag (p7, p18, p24, p55).²

Penyebaran global HIV tidak dapat dicegah. Pada tahun 2000, empat puluh juta orang terinfeksi dan merupakan penyebab kematian 20 juta orang baik dewasa maupun anak-anak sejak diidentifikasinya virus tersebut pada tahun 1980-an.³ Menurut data tahun 2005, saat ini penderita AIDS di berbagai wilayah di dunia lebih dari setengahnya adalah anak-anak.⁴

Mengingat penyebarannya yang cepat ini maka diperlukan suatu tes diagnosis yang dapat dengan akurat mendeteksi timbulnya kasus baru dan mengevaluasi keberhasilan suatu terapi yang dilakukan pada pasien dengan HIV. Tes yang diharapkan adalah yang memenuhi kriteria sensitif, spesifik, cepat dan berbiaya murah. Dengan kemajuan teknologi, telah dikembangkan tes diagnostik baru untuk

memenuhi kriteria di atas. Di sebagian negara di kawasan Asia Tenggara dan Afrika, insidensi dan prevalensi HIV 1 terus mengalami peningkatan.

Sejak publikasi tentang AIDS dilakukan pada tahun 1981, banyak penelitian dilakukan untuk mengisolasi dan mengonfirmasi penyebab penyakit ini. Metode skrining yang sensitif dibuat untuk menegakkan diagnosis yang tepat. Menggunakan metode yang ada, *solid phase serology assay* dikembangkan dan menunjukkan hasil yang sensitif dan spesifik. Metode ELISA merupakan metode serologi yang banyak digunakan dalam mendeteksi adanya antigen atau antibodi terhadap HIV. Dasar dari pemeriksaan ini adalah mendeteksi antigen yang diproduksi oleh virus atau antibodi yang dihasilkan oleh *host* sebagai respon imun terhadap antigen virus yang ada, walaupun kemunculan respon antibodi ini berbeda satu dengan yang lain.⁵ Protein utama yang merupakan target antibodi adalah protein env (gp41, gp120, gp160), pol (p66, p31), dan gag (p7, p18, p24, p55).

Deteksi dini terhadap infeksi HIV sangat penting karena pada masa-masa awal infeksi sebelum ditemukan gejala klinis yang berhubungan dengan infeksi ini. Deteksi dini ini dapat dilakukan dengan mencari antigen p24 pada serum.⁶

Saat ini kit diagnostik HIV-1 yang dipasarkan merupakan kit buatan pabrik yang berasal dari luar Indonesia. Padahal subtipe HIV berkorelasi positif dengan lokasi, etnis dan keganasan penyakit.^{7,8} Adanya banyak variasi dari HIV menyebabkan kit diagnostik mempunyai peluang lebih besar untuk menunjukkan hasil pemeriksaan yang tidak akurat. Oleh karena itu kit diagnostik HIV-1 sebaiknya menggunakan antigen atau antibodi yang sesuai dengan distribusi geografik HIV 1 sehingga dapat ditingkatkan sensitivitas dan spesifisitasnya.

ELISA merupakan pemeriksaan serologi yang menggunakan prinsip interaksi antara antigen-antibodi. Prinsip ELISA adalah menempelkan antigen atau antibodi pada fase solid (matriks) dan menginkorporasi konjugat dan substrat.⁹ ELISA dapat mengenali antigen atau antibodi melalui metode pemeriksaan tidak langsung (*sandwich*), pemeriksaan langsung, metode kompetisi dan *capture assay*. Untuk skrining terhadap HIV-1, metode ELISA langsung umumnya digunakan.¹⁰

Di Laboratorium Mikrobiologi FKUI telah dikembangkan teknik pendeteksi antigen P24 rekombinan HIV-1 berdasarkan sistem sandwich ELISA melalui penelitian yang dilakukan Apriliana E, *et al.* Hasil yang diperoleh terdapat ikatan non spesifik antara serum kelinci yang merupakan antibodi pendeteksi pada sistem dengan antigen lain, yang diduga protein E.coli. Ikatan non spesifik ini meningkatkan nilai absorbansi sistem sehingga mengganggu interpretasi hasil.¹¹

Antibodi yang digunakan dalam pengembangan sistem sandwich ELISA pendeteksi antigen rekombinan P24 HIV-1 ini adalah antibodi poliklonal yang berasal dari marmut dan kelinci pasca imunisasi dengan protein P24 rekombinan HIV-1. Diperkirakan terdapat antibodi non spesifik terhadap protein tersebut, yaitu antibodi yang terbentuk karena adanya protein non spesifik yang mungkin terdapat dalam preparasi antigen rekombinan. Protein rekombinan yang digunakan untuk imunisasi diperoleh melalui proses ekspresi pada bakteri sehingga dikhawatirkan protein bakteri pengeksresi tersebut masih terdapat pada larutan yang diinjeksikan ke hewan coba. Pada penelitian Apriliana E,*et al* diperoleh informasi bahwa terdapat infeksi pada kelinci yang digunakan selama uji coba.¹¹ Oleh karena itu diperlukan suatu metode untuk memurnikan antibodi poliklonal dalam sistem sandwich ELISA. Pemurnian bertujuan untuk menghilangkan antibodi yang dapat mengenali antigen lain selain antigen P24 rekombinan HIV-1 sehingga metode ELISA yang dikembangkan dapat lebih spesifik.

Berdasarkan hal ini, maka dalam penelitian dilakukan purifikasi antibodi poliklonal sebagai reagensia sistem sandwich ELISA pendeteksi protein P24 HIV-1. Hasil penelitian ini diharapkan dapat digunakan dalam pengembangan metode diagnosis infeksi HIV-1 dan mengurangi ketergantungan penggunaan kit komersial yang berasal dari luar Indonesia.

1.2. Tujuan Penelitian

Tujuan Umum :

Memperoleh informasi tentang metode purifikasi antibodi poliklonal dengan teknik kromatografi afinitas untuk mendapatkan antibodi dengan reaktivitas

spesifik terhadap protein P24 HIV-1 sebagai reagensia “sandwich ELISA” pendeteksi protein P24 HIV-1.

Tujuan Khusus :

1. Memperoleh informasi mengenai reaktivitas antibodi yang berasal dari serum kelinci dan marmut yang telah diproduksi terhadap protein rekombinan P24 HIV-1 pada penelitian terdahulu.
2. Memperoleh informasi mengenai ikatan non spesifik antara komponen-komponen yang terlibat untuk mendeteksi antigen protein rekombinan HIV-1 dalam sistem sandwich ELISA
3. Memperoleh informasi kondisi optimal purifikasi antibodi spesifik P24 HIV-1 mengenali protein rekombinan yang berasal dari serum kelinci untuk menghilangkan ikatan non spesifik pada metode *sandwich* ELISA yang akan dikembangkan di kemudian hari.
4. Memperoleh informasi konsentrasi optimal antibodi yang berasal dari serum kelinci yang telah dipurifikasi untuk mendeteksi antigen protein rekombinan P24 HIV-1.

1.3. Manfaat Penelitian

1. Metode purifikasi antibodi poliklonal ini dapat digunakan dalam pemurnian antibodi poliklonal anti HIV-1 yang dihasilkan melalui imunisasi binatang percobaan dengan antigen P24 HIV-1 rekombinan ber-tag Histidin.
2. Informasi yang diperoleh bermanfaat untuk mengembangkan metode purifikasi antibodi poliklonal yang spesifik terhadap protein P24 HIV-1.
3. Informasi yang diperoleh dalam penilaian reaktivitas komponen-komponen sandwich ELISA bermanfaat untuk digunakan sebagai bahan pertimbangan dalam persiapan pengembangan prototipe kit sandwich ELISA pendeteksi antigen P24 HIV-1 menggunakan antibodi poliklonal P24 HIV-1 hasil induksi dengan antigen rekombinan P24 HIV-1 .

BAB 2

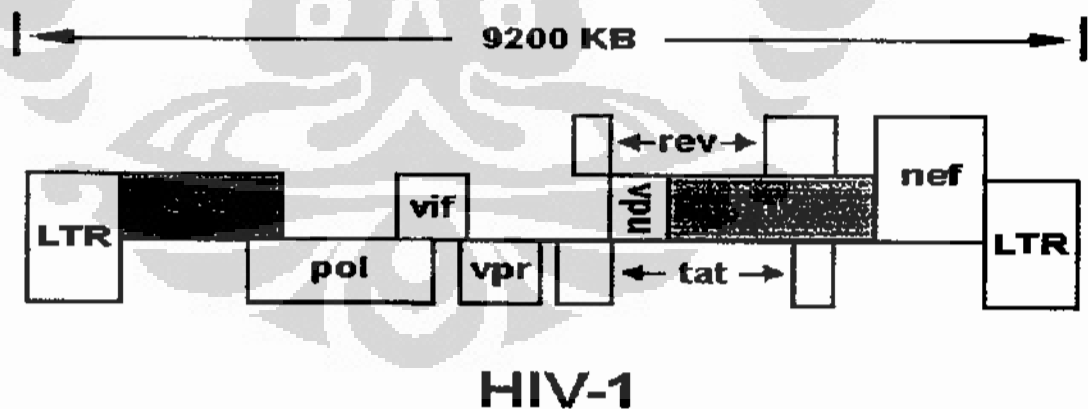
TINJAUAN PUSTAKA

2.1. *Human Immunodeficiency Virus*

2.1.1. Karakteristik Biologi HIV-1

Acquired Immunodeficiency Syndrome (AIDS) adalah penyakit yang disebabkan karena infeksi HIV (Human Immunodeficiency Virus). AIDS mempunyai karakteristik menekan sistem imun dan diikuti munculnya infeksi oportunistik, keganasan, atau degenerasi sistem saraf sentral. HIV menginfeksi sel-sel yang terlibat dalam sistem pertahanan tubuh, diantaranya T helper, makrofag, dan sel dendritik.

Virus HIV merupakan retrovirus dengan subfamili: Lentivirus. Lentivirus berbeda dengan retrovirus yang lain ditinjau dari organisasi genom dan morfologi virion. Walaupun HIV dan lentivirus yang lain mempunyai gen gag, pol dan env, namun tidak terdapat homologi antara gen-gen tersebut. Pada HIV terdapat pula 6 gen tambahan yang berperan dalam infeksi dan ekspresi gen virus tersebut. Gen-gen tersebut diantaranya adalah tat, rev, nef, vif, vpr, dan vpu (lihat gambar 2.1).

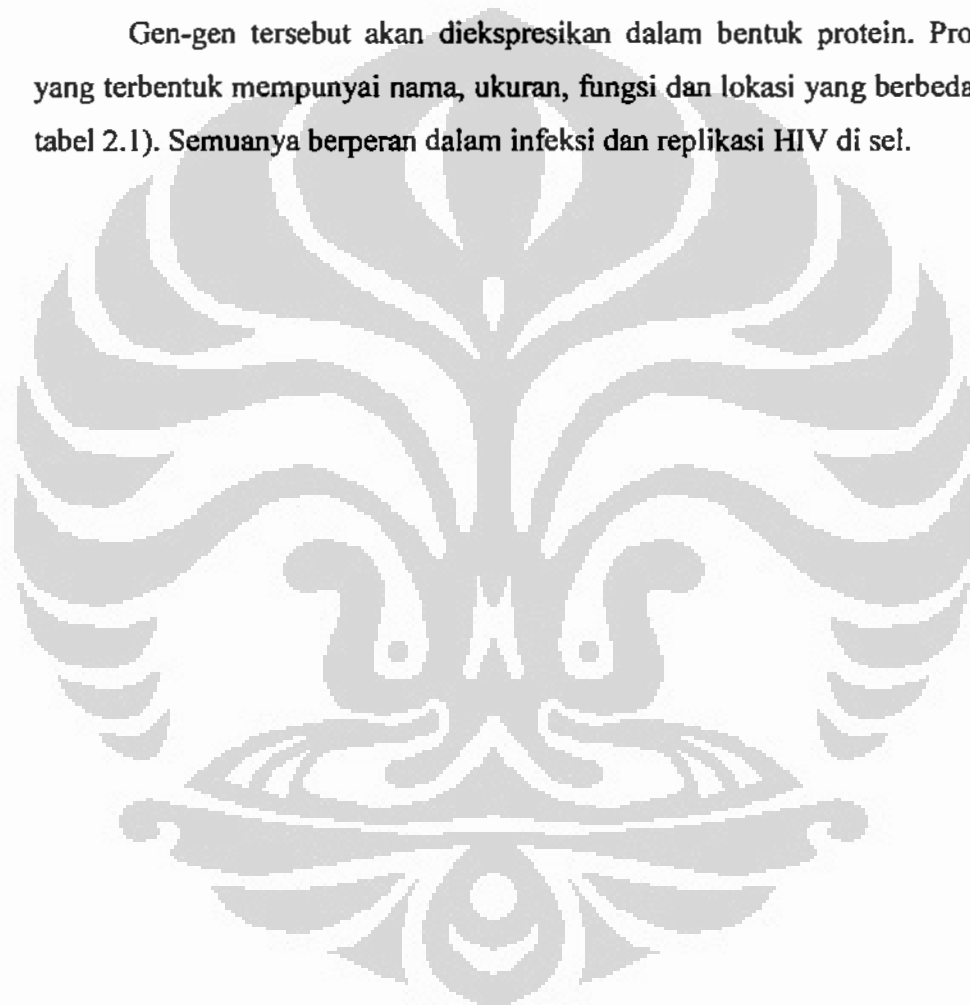


Gambar 2.1. Genome HIV 1¹²

Gen pada HIV terdiri dari gen struktural (gag, pol, env), gen regulator (tat, rev) dan gen aksesoris (nef, vif, vpr dan vpu). Gag berperan dalam mengkode protein matriks, kapsid dan nukleokapsid yang membentuk protein utama virus. Pol berperan

dalam mengkode pembentukan protease, reverse transcriptase dan integrase. Env berperan dalam mengkode antigen permukaan HIV gp 160 yang terdiri dari gp 120 dan gp 41. Tat berperan dalam protein trans aktivasi transkripsi, rev berperan dalam regulator sintesis dan ekspor mRNA virus. Gen aksesoris seperti nef berperan dalam regulasi CD4, vif berperan dalam faktor infeksius HIV, vpr berperan dalam regulasi siklus sel dan vpu berperan dalam keluarnya virus dari sel yang terinfeksi.¹³

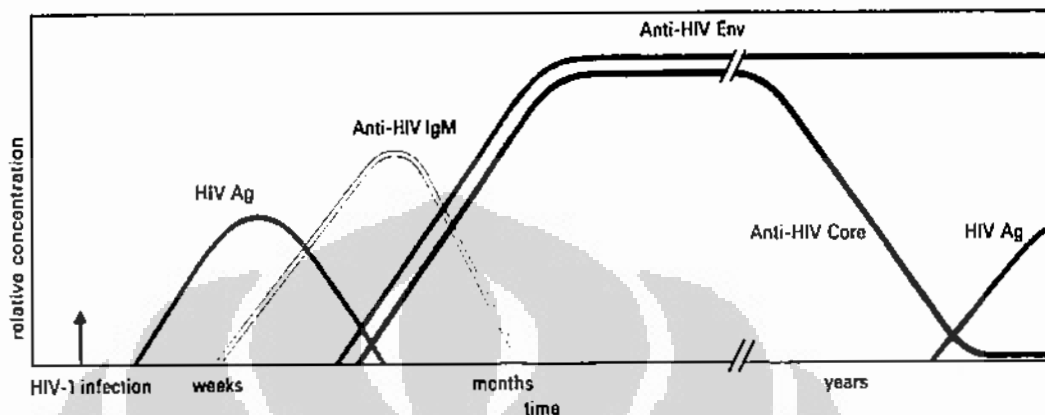
Gen-gen tersebut akan diekspresikan dalam bentuk protein. Protein-protein yang terbentuk mempunyai nama, ukuran, fungsi dan lokasi yang berbeda-beda (lihat tabel 2.1). Semuanya berperan dalam infeksi dan replikasi HIV di sel.



Tabel 2.1. Protein pada HIV.¹⁴

Nama	Ukuran	Fungsi	Lokasi
Gag MA	p17	Membentuk membran, interaksi dengan env, transport ke daerah inti virus.	Virion
Gag CA	p24	Membentuk kapsid	Virion
Gag NC	p7	Membentuk nukleokapsid, berikatan dengan RNA	Virion
Protease	p15	Pembelahan gag-pol dan maturasi	Virion
Reverse Transcriptase, RNase H	p66	Reverse transkripsi, aktivitas RNase H	Virion
Integrase		Integrasi DNA provirus	Virion
Env	Gp120/gp41	Glikoprotein eksternal virus yang berikatan dengan reseptor CD4	Membran plasma, envelope virus.
Tat	p16/p14	Transaktivator transkripsi virus	Nukleolus/nukleus
Rev	p19	Transpor RNA	Terutama di nukleolus/nukleus
Vif	p23	Maturasi virion dan kemampuannya untuk menginfeksi sel	Sitoplasma, virion
Vpr	p10-15	Lokalisasi nukleus pada kompleks preintegrasi, menghambat pembelahan sel, mengistirahatkan sel yang terinfeksi pada fase G2/M	Virion, nukleus
Vpu	P16	Pengeluaran virus ekstraselular, mendegradasi CD4 pada retikulum endoplasma	Membran protein integral
Nef	P27/p25	Downregulation CD4	Plasma membran. Sitoplasma

2.1.2. Kinetika Respon Imun pada Infeksi HIV-1



Gambar 2.2. Profil serologi infeksi HIV¹⁵

Dalam waktu 4-8 minggu setelah pemaparan oleh virus, individu yang terinfeksi mengalami gejala akut seperti gejala influenza. Periode ini berlangsung selama beberapa hari sampai beberapa minggu dan diikuti oleh replikasi aktif virus. Hal ini dapat diamati dengan meningkatnya level virus di sirkulasi dan ekspresi antigen p24 yang dapat diukur.¹⁴ Keberadaan antigen p24 terdapat dalam jumlah besar selama masa *window period*. Hal ini diikuti dengan kemunculan antibodi p24 yang menandakan penurunan antigen p24 di sirkulasi. Antibodi p24 tetap berada dalam sirkulasi sampai antibodi terhadap antigen *envelope*, gp 41 dan gp 120 muncul. Setelah munculnya gejala akut, level antibodi spesifik terhadap virus meningkat dan dapat dikuantifikasi oleh metode serologi.

Memasuki fase akhir, terjadi penurunan antibodi yang spesifik terhadap protein inti (*core protein*). Sedangkan antibodi terhadap protein *envelope* menetap. Penurunan antibodi terhadap protein inti menyebabkan peningkatan replikasi virus, ditandai dengan meningkatnya jumlah antigen HIV. Pada masa ini pemeriksaan diagnostik pendeteksi protein P24 dapat digunakan kembali.

2.1.3. Pemeriksaan Serologi terhadap Infeksi HIV-1

Pemeriksaan terhadap infeksi HIV-1 pertama kali dipublikasikan pada Maret 1985 untuk pendeteksian awal keberadaan HIV dalam darah hasil donor. Dasar dari pemeriksaan ini adalah mendeteksi antigen yang diproduksi oleh virus atau antibodi yang dihasilkan oleh hospes sebagai respon imun terhadap antigen virus yang ada, walaupun kemunculan respon antibodi ini berbeda satu dengan yang lain.¹⁴ Protein utama yang merupakan target antibodi adalah protein env (gp41, gp120, gp160), pol (p66, p31), dan gag (p7, p18, p24, p55).

Sejak publikasi tentang AIDS dilakukan pada tahun 1981, banyak penelitian dilakukan untuk mengisolasi dan mengonfirmasi penyebab penyakit ini. Metode skrining yang sensitif dibuat untuk menegakan diagnosis. Menggunakan metode yang ada, *solid phase serology assay* dikembangkan dan menunjukkan hasil yang sensitif dan spesifik. Secara komersil, pemeriksaan dengan teknik ini dapat dikembangkan dalam bentuk kit yang sederhana sehingga dapat lebih murah dan digunakan dalam skala besar.

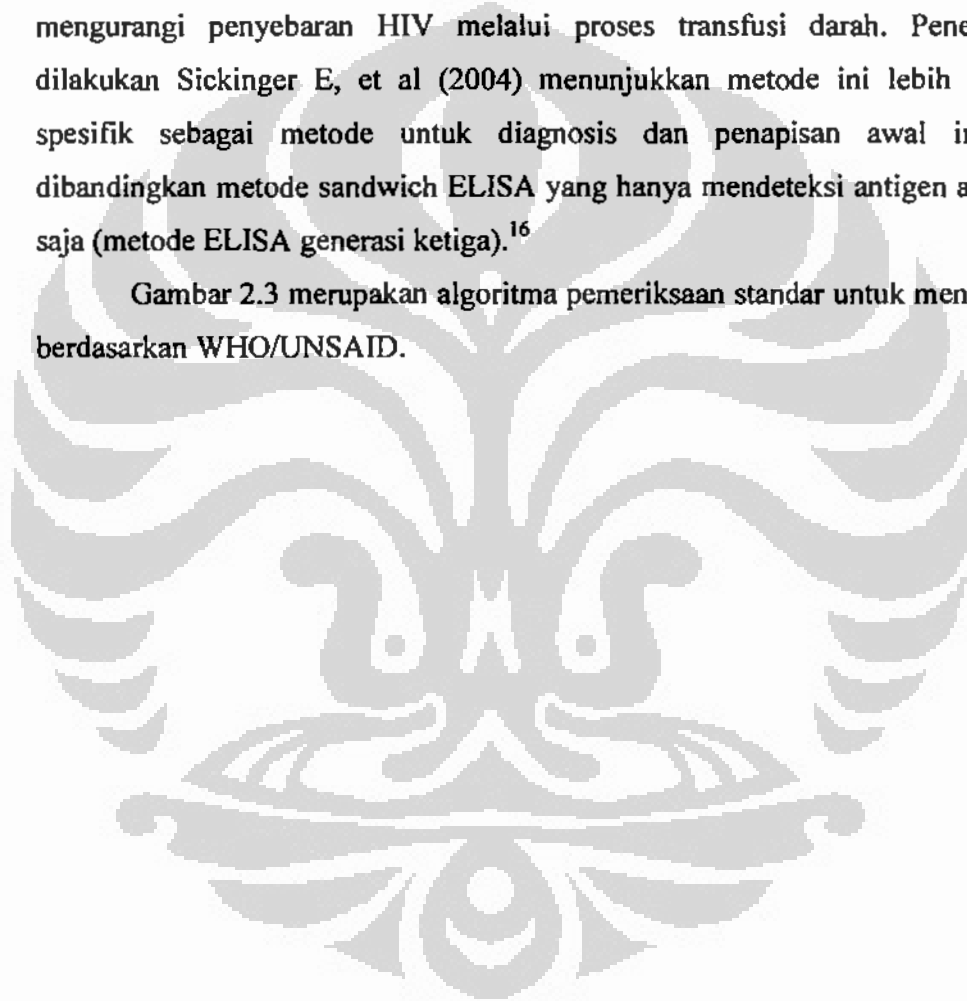
Pemilihan metode sandwich ELISA dalam mendeteksi antigen P24 HIV-1 bertujuan untuk mendeteksi antigen tersebut pada saat awal infeksi HIV.

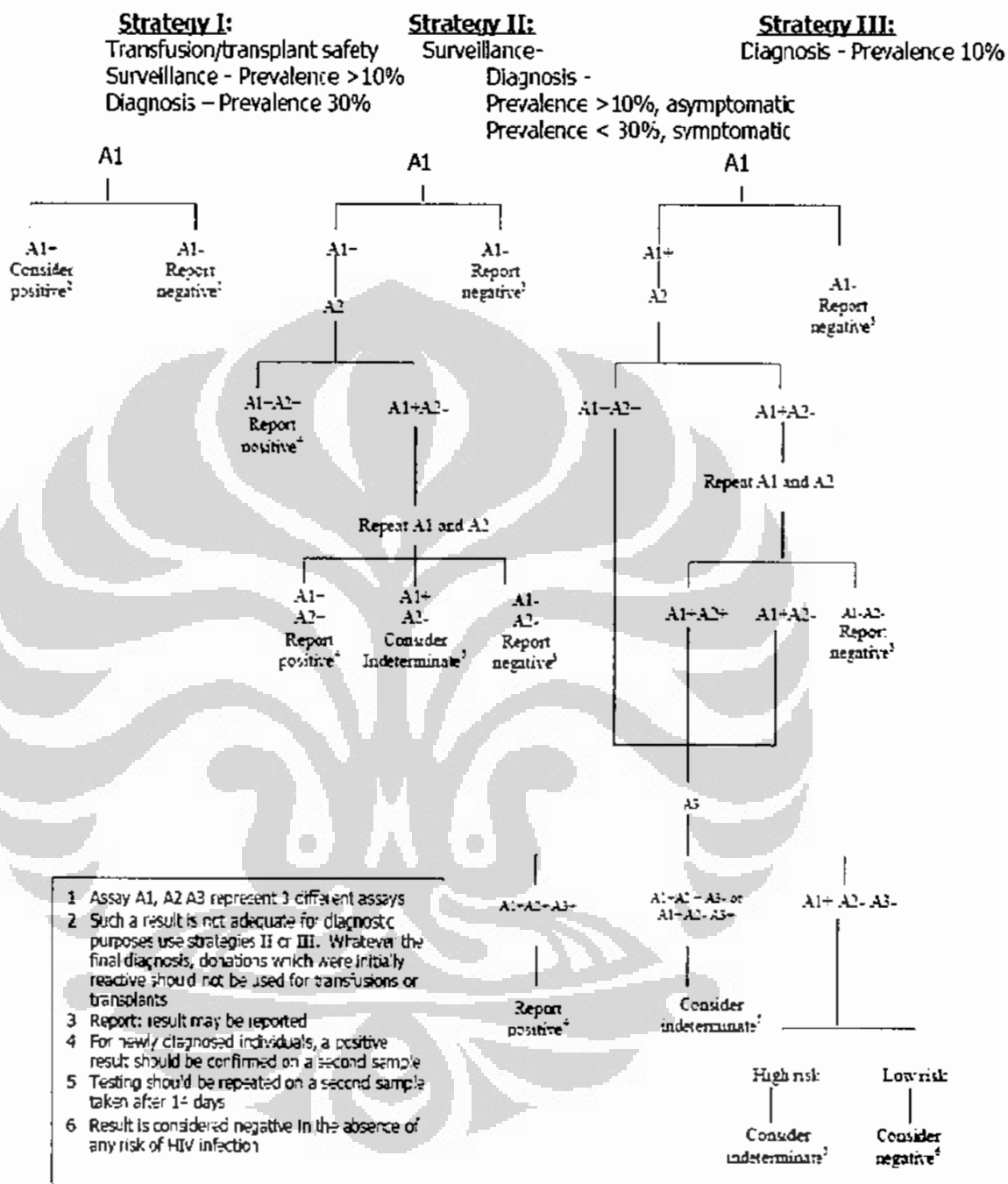
Miles *et al.* (1993) mengembangkan metode yang mendeteksi antigen P24 bebas dan P24 terikat antibodi dalam serum. Metode ini disebut sebagai *ICD (Immune Complex Dissociation)*. Metode ini merupakan sistem sandwich ELISA dengan antibodi poliklonal yang terikat pada fase diam sebagai antibodi penangkap dan antibodi monoklonal terhadap P24 sebagai antibodi pendeteksi. Untuk menghilangkan kemungkinan positif palsu, dilakukan netralisasi dengan melakukan inkubasi sampel dengan larutan yang mengandung antibodi terhadap P24. Kemungkinan positif palsu dihilangkan jika nilai absorbansi sampel dengan netralisasi minimal berkurang sebanyak 50% dari nilai absorbansi sampel tanpa netralisasi. Sebelum dilakukan pemeriksaan, dilakukan preparasi sampel dengan memberikan 1,5 M glycine HCl (pH 1,8) dengan jumlah yang sama dengan sampel untuk memutuskan kompleks antigen-antibodi pada serum selama 90 menit pada suhu 37°C. Untuk menetralkan pH digunakan 1,5 M Tris HCl (pH 7,4). Kekurangan dari metode ini adalah hanya

antigen P24 saja yang mampu dideteksi di serum, sedangkan glikoprotein *envelope* tidak terdeteksi.¹⁵

Untuk mengatasi kelemahan model pemeriksaan di atas, telah dikembangkan suatu metode pemeriksaan ELISA generasi keempat yang mendeteksi antigen P24 sekaligus antibodi terhadap protein transmembran HIV. Metode ini bertujuan untuk mengurangi hasil seronegatif pada saat fase *window period* sehingga dapat mengurangi penyebaran HIV melalui proses transfusi darah. Penelitian yang dilakukan Sickinger E, et al (2004) menunjukkan metode ini lebih sensitif dan spesifik sebagai metode untuk diagnosis dan penapisan awal infeksi HIV dibandingkan metode sandwich ELISA yang hanya mendeteksi antigen atau antibodi saja (metode ELISA generasi ketiga).¹⁶

Gambar 2.3 merupakan algoritma pemeriksaan standar untuk mendeteksi HIV berdasarkan WHO/UNSAID.





Gambar 2.3. Skema strategi pemeriksaan HIV yang direkomendasikan WHO/UNAIDS ¹⁷

2.2. Antigen dan Antibodi

2.2.1. Antigen

Pemeriksaan serologi melibatkan tiga komponen yaitu antigen, antibodi dan kekuatan ikatan antara keduanya. Ketiganya memegang peranan yang penting sehingga ketiganya akan dibahas dalam makalah ini.

Imunogen adalah molekul yang dapat menstimulasi respon imun, baik respon imun spesifik maupun nonspesifik. Antigen dahulu diartikan sebagai molekul yang dapat merangsang pembentukan antibodi, tetapi saat ini antigen merupakan istilah yang digunakan untuk menyebut substansi yang mampu bereaksi dengan antibodi yang diproduksi atas rangsangan imunogen, tanpa mempertimbangkan apakah antigen itu bersifat imunogenik.¹⁸ Oleh karena itu, hampir seluruh molekul biologik, termasuk karbohidrat, lipid, protein dan asam nukleat adalah antigen, namun hanya makromolekul yang bersifat imunogenik saja yang mampu merangsang aktivasi respon imun.

Antigen mempunyai bagian yang bereaksi dengan antibodi atau dengan reseptor spesifik pada limfosit T. Bagian tersebut disebut epitop atau *antigenic determinant*. Epitop bersifat spesifik, satu epitop dengan epitop yang lain dapat merangsang respon imun yang berbeda-beda.

Antigen dapat menimbulkan efek imunogenik yang berbeda-beda. Hal ini tergantung pada ukuran molekul, kompleksitas molekul, dosis, cara antigen tersebut masuk ke dalam tubuh dan dari mana antigen tersebut berasal. Lebih besar ukuran dan lebih kompleks, maka lebih imunogenik molekul tersebut. Dosis yang terlalu besar atau terlalu kecil dapat menyebabkan toleransi respon imun. Oleh karena itu diperlukan dosis tertentu yang optimal merangsang respon imun. Antigen yang masuk ke dalam tubuh melalui subkutan dan intradermal lebih imunogenik daripada antigen yang masuk melalui oral dan intravena.¹⁹ Antigen yang merupakan bagian asing dari tubuh (nonself antigen) bersifat lebih imunogenik daripada yang berasal dari tubuh (self antigen).

2.2.2. Antibodi

Antibodi timbul karena adanya ikatan antara antigen dengan reseptor permukaan pada sel limfosit B *naive* sehingga merangsang teraktivasinya respon imun humoral. Hal ini yang menyebabkan sel limfosit B memproduksi antibodi. Antibodi dapat ditemukan dalam retikulum endoplasma, badan golgi dan pada permukaan sel B. Antibodi yang berbentuk sekresi dapat ditemukan di plasma darah, mukosa dan cairan interstisial jaringan.

Pada saat darah membentuk gumpalan, antibodi tetap berada pada cairan residunya yang disebut serum. Serum yang terdiri dari sejumlah molekul antibodi yang berikatan dengan antigen disebut sebagai antiserum. Konsentrasi antibodi serum yang spesifik untuk antigen tertentu dapat ditentukan dengan cara membuat pengenceran serial sampai ikatan antigen antibodi tidak dapat diamati lagi. Serum dengan antibodi konsentrasi tinggi dalam mengikat antigen tertentu disebut mempunyai titer yang tinggi.¹⁹

Pada proses elektroforesis, plasma atau serum glikoprotein dapat dipisahkan berdasarkan karakteristik larutannya menjadi albumin dan globulin dalam medan listrik. Antibodi ditemukan dalam grup globulin yang disebut gamaglobulin. Oleh karena itu antibodi dapat disebut imunoglobulin.

Struktur dasar imunoglobulin terdiri atas dua rantai berat (*heavy chain*) yang identik dan dua rantai ringan (*light chain*) yang identik. Setiap rantai ringan berukuran 24 kDa, sedangkan rantai berat bervariasi dari 55-70 kDa. Satu rantai ringan berikatan secara kovalen dengan satu rantai berat melalui ikatan disulfida dan dua rantai berat saling berikatan satu sama lain dengan ikatan disulfida pula. Rantai ringan dan rantai berat berisi unit homolog yang berulang, masing-masing terdiri atas panjangnya 110 residu asam amino, yang berlipat-lipat membentuk motif globuler yang disebut Ig domain. Setiap Ig domain terdiri dari 2 lapisan β *pleated sheet*, setiap lapisan terdiri dari 3 sampai 5 strands rantai polipeptida yang paralel. Protein penting yang lain dalam sistem imun terdiri dari domain dengan motif lipatan dan sekuens asam amino yang sama dengan sekuens asam amino Ig. Semua molekul yang memiliki motif yang sama ini disebut *Ig super family*.¹⁹

Rantai berat dan rantai ringan terdiri dari regio variabel (*variable region*) amino terminal yang berperan dalam pengenalan antigen dan regio konstan (*constant region*) karboksi terminal yang berfungsi sebagai efektor. Pada rantai berat, regio variabel terdiri dari satu domain Ig dan regio konstan terdiri dari tiga atau empat domain Ig. Rantai ringan terdiri dari satu domain Ig pada satu regio variabel dan satu Ig domain pada satu regio konstan.

Disebut sebagai regio variabel karena pada regio ini terdapat sekuens asam amino yang bervariasi yang membedakan antibodi yang dibentuk oleh satu klon limfosit B dengan klon limfosit B lainnya. Satu regio variabel yang berasal dari rantai berat bekerja sama dengan satu regio variabel yang berasal dari rantai ringan membentuk daerah menempelnya antigen (*antigen binding site*). Oleh karena itu setiap molekul antibodi terdiri dari dua *antigen binding site*.^{18,19}

Regio konstan tidak berperan dalam pengenalan antigen. Regio konstan rantai berat berinteraksi dengan molekul efektor lainnya dan memediasi fungsi biologik suatu antibodi. Karboksi terminal dari rantai berat menghubungkan antibodi permukaan dengan membran plasma pada limfosit B. Regio konstan pada rantai ringan tidak berpartisipasi dalam fungsi efektor dan tidak menempel pada membran sel. Regio konstan pada rantai ringan membagi antibodi menjadi dua kelas yaitu κ dan λ .

Molekul antibodi terbagi menjadi kelas dan subkelas yang berbeda-beda berdasarkan perbedaan dalam struktur regio konstan rantai berat. Kelas pada antibodi disebut sebagai isotipe dan terdiri dari IgA (monomer, dimer, trimer), IgD, IgE (monomer), IgG (monomer) dan IgM (pentamer). Pada manusia Ig A dan IgG terbagi lagi menjadi subkelas atau subtipe yaitu IgA1, IgA2, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4.

2.2.2.1. Purifikasi Antibodi

Analisis serologi secara *in vitro* yang melibatkan antibodi memerlukan proses purifikasi. Hal ini bertujuan untuk mengeliminasi patogen yang potensial dan efek non spesifik yang ditimbulkan oleh komponen serum yang lain. Protokol standar purifikasi bergantung pada aplikasi serologi yang akan dikembangkan. Umumnya

metode yang dipakai berdasarkan ikatan yang melibatkan subklas antibodi, protein presipitasi atau metode lain berdasarkan ikatan spesifik antibodi. Namun informasi yang membahas mengenai integritas dan aktivitas fungsi antibodi dengan berbagai metode purifikasi masih sangat terbatas.²⁰

Antibodi dan fragmennya dapat berasal dari alam maupun dari sumber protein rekombinan. Sumber darimana antibodi tersebut berasal dapat menjadi dasar pemilihan teknik purifikasi antibodi. Pemilihan yang selektif dari medium afinitas purifikasi dapat meminimalkan kontaminasi dan memberikan hasil purifikasi yang maksimal dengan hanya melakukan satu kali purifikasi saja.²¹



Tabel 2.2. Sumber antibodi dan kontaminan yang mungkin ditemui²¹

	Tipe molekul	Kontaminan	Kuantitas
Sumber: ALAM			
Serum manusia	IgG poliklonal, IgM, IgA, IgD, IgE	Albumin, transferin, $\alpha 2$ makroglobulin, beberapa serum protein	IgG 8-16 mg/ml IgM 0,5-2 mg/ml IgA 1-4 mg/ml IgE 10-400 ng/ml IgD sampai dengan 0,4 mg/mL
Hibridoma	Antibodi monoklonal	Phenol merah, air, albumin, transferin, bovine IgG, $\alpha 2$ makroglobulin, beberapa serum protein, virus	Sampai dengan 1 mg/ml
Hibridoma: supernatant sel kultur tanpa serum	Antibodi monoklonal	Albumin, transferin	Sampai dengan 0,05 mg/ml
Cairan asites	Antibodi monoklonal	Lemak, albumin, transferin, lipoprotein, IgG endogen, beberapa protein hospes	1-15 mg/ml
Kuning telur ayam	IgY	Lemak, lipoprotein, dan vitelin	IgY 3-4 mg/ml
Sumber: Rekombinan			
Protein ekstraseluler yang diekspresikan pada supernatant	Antibodi dengan penanda tag, protein fusi antibodi, Fab atau fragmen F(ab') ₂	Protein dari hospes, misalnya E.coli, beberapa kontaminan umum lainnya	Tergantung sistem ekspresi yang digunakan
Ekspresi protein intraseluler		Protein dari hospes, misalnya E.coli dan faga	Tergantung sistem ekspresi yang digunakan

Metode purifikasi protein yang paling baik adalah metode imunopresipitasi dan kromatografi afinitas. Keduanya menunjukkan molekul antibodi yang spesifik. Namun hal ini tergantung dari afinitas antibodi terhadap antigen. Hasil optimal terjadi bila afinitas antigen dan antibodi antara 10^6 M^{-1} dan 10^8 M^{-1} . Semakin rendah afinitasnya, antibodi spesifik hasil purifikasi tersebut semakin sedikit. Walaupun demikian afinitas yang terlalu tinggi dapat menyebabkan sulitnya proses elusi antibodi dari kolom afinitas tanpa menyebabkan denaturasi.²² Selain afinitas, proses elusi juga tergantung dari jenis ikatan antara antibodi dan antigen.²³

Kromatografi afinitas memiliki keunggulan diantaranya adalah separasi yang cepat, sederhana dan menggunakan antigen yang spesifik sehingga menghasilkan antibodi yang spesifik terhadap antigen tersebut.^{22,24} Antibodi poliklonal yang dipurifikasi diabsorpsi ke dalam antigen yang berperan sebagai ligan yang telah diimmobilisasi pada beads.²² Untuk mengelusi antibodi yang terikat ligan, dilakukan beberapa metode elusi, diantaranya: (1) Mengubah pH menjadi lebih tinggi atau lebih rendah daripada pI antibodi, (2) Meningkatkan kekuatan ionik dengan cara meningkatkan konsentrasi garam secara gradien, (3) Menggunakan larutan pengelusi yang berperan sebagai kompetitor antibodi sehingga ikatan antigen antibodi dapat dilepaskan, (4) Mengurangi polaritas antibodi, (5) Mengubah bentuk antibodi.²⁴ Teknik kromatografi afinitas ini dapat dilakukan pada eksperimen berskala kecil maupun besar.^{22,25}

Teknik penempelan ligan pada fase tidak bergerak merupakan langkah yang paling penting pada kromatografi afinitas. Beberapa hal yang perlu diperhatikan untuk pemilihan fase tidak bergerak adalah (1) Mengandung bahan yang memiliki porositas sesuai untuk kolom kromatografi, (2) Mempunyai daya adsorpsi non spesifik yang minimal, (3) Memiliki kapasitas tinggi yang dapat menampung konsentrasi ligan yang besar per unitnya, dan (4) Memiliki daya kelarutan yang rendah.²⁵

Makromolekul yang memiliki grup amino primer dapat dengan mudah dilekatkan pada beads agarose dengan menggunakan metode aktivasi cyanogen bromida. Metode ini menghasilkan ligan tidak terlarut yang sesuai dengan banyak prosedur kromatografi afinitas. Cyanogen bromida pada pH yang tinggi akan bereaksi

dengan gugus hidroksil yang berasal dari agarose membentuk produk teraktivasi yang dapat melekatkan gugus amino primer pada pH yang netral. Hasilnya akan terbentuk ikatan isourea antara agarose dan ligan.²⁵ Cyanogen bromida yang teraktivasi mempunyai bentuk stabil dan dapat disimpan pada kondisi terkontrol.

Keuntungan menggunakan cyanogen bromida adalah mempunyai kapasitas yang tinggi dalam pelekatan ligan. Sedangkan kerugiannya adalah bahan ini memiliki toksisitas yang tinggi dan ikatan isourea yang dihasilkan tidak stabil karena adanya penambahan muatan. Hal ini dapat dikurangi dengan menambahkan minimal 100 mM garam pada larutan dapar yang digunakan. Ketidakstabilan ini menjadi masalah utama jika kolom kromatografi digunakan berulang kali atau terpapar oleh temperatur tinggi, dan pH yang ekstrim.²³

2.2.3. Ikatan antigen dan antibodi

Antibodi mengikat antigen pada epitop atau determinan antigennya. Determinan antigen yang multipel dan identik pada antigen disebut polivalensi atau multivalensi. Hampir seluruh protein globuler tidak memiliki epitop multipel yang identik sehingga disebut tidak polivalen, kecuali dalam bentuk agregat.¹⁹ Polisakarida dan asam nukleat mempunyai banyak struktur epitop yang identik sehingga molekulnya disebut polivalen.

Pengenalan antigen oleh antibodi melibatkan ikatan non kovalen yang bersifat reversibel. Ikatan tersebut meliputi ikatan elektrostatik, ikatan hidrogen, ikatan van der Waals dan ikatan hidrofobik. Kekuatan yang terjadi antara satu antigen binding site suatu antibodi dengan satu epitop disebut sebagai afinitas. Afinitas ini dinyatakan dalam suatu konstanta disosiasi (K_d), yang menyatakan jumlah konsentrasi antigen yang diperlukan untuk membentuk ikatan dengan setengah jumlah antibodi yang terdapat dalam larutan. K_d yang lebih kecil mengindikasikan bahwa afinitas yang terjadi lebih kuat atau lebih besar karena konsentrasi ag yang diperlukan lebih rendah untuk membentuk ikatan.¹⁹

Jumlah total afinitas yang terjadi antara antibodi dengan polivalen antigen disebut sebagai aviditas.

Interaksi antara antigen dan antibodi dapat dibedakan menjadi ²⁶ :

1. Interaksi Primer

Yaitu interaksi yang terjadi antara satu epitop suatu antigen dengan antibodi melalui ikatan nonkovalen yang reversibel. Contoh: reaksi *immunoassay*

2. Interaksi Sekunder

Yaitu interaksi antara antibodi dengan polivalen antigen yang berbentuk larutan atau partikel (seperti partikel yang tidak terlarut) dan menyebabkan terjadinya *cross-linking* antara berbagai partikel antigen oleh antibodi tersebut. *Cross-linking* ini dapat diamati dengan munculnya endapan. Interaksi ini hanya terbentuk apabila antigen bersifat polivalen, dengan antibodi yang divalen, keduanya dalam konsentrasi yang seimbang. Contoh: reaksi aglutinasi dan presipitasi

2.2.3.1. Enzyme Linked Immunoassay (ELISA)

ELISA merupakan pemeriksaan serologi yang menggunakan prinsip primer interaksi antara antigen-antibodi. Prinsip ELISA adalah menempelkan antigen atau antibodi pada fase solid (matriks) dan menginkorporasi konjugat dan substrat.

Antigen virus dapat berupa *whole virus lysates*, peptida rekombinan atau sintetik. Matriks berupa *microplate*, *plastic beads*, kertas nitroselulosa. Konjugat berupa enzim (alkalin fosfatase atau *horseradish peroxidase*), flourokrom, atau reagen lain yang menimbulkan reaksi yang dapat diamati secara visual. Konjugat ini akan berikatan dengan antibodi yang berasal dari serum yang berasal dari tersangka pengidap HIV atau spot serum yang kering.²⁷ Enzim dapat menimbulkan reaksi warna, sedangkan flourokrom dapat berfloresensi. Substrat yang digunakan adalah *4-nitrophenilphosphate* untuk alkaline fosfatase dan *o-phenxylenediamine dihydrochloride (OPD)* dan TMB untuk *horseradish peroxidase*, yang dapat memproduksi warna jika bergabung dengan enzim. Warna tersebut dapat dideteksi secara visual dan dapat diukur sebagai nilai absorbansi.

Hasil pemeriksaan dengan ELISA dapat menunjukkan positif palsu atau negatif palsu. Oleh karena itu pada diperlukan metode konformasi untuk memastikan

tidak terdapat keduanya. Hasil positif palsu dapat terjadi karena ketidaktepatan metode yang dilakukan pada saat melakukan pemeriksaan, terdapatnya reaktif antibodi, penyakit hati, pemberian imunoglobulin pasif. Sedangkan negatif palsu dapat terjadi karena ketidaktepatan metode yang dilakukan saat pemeriksaan atau pemeriksaan dilakukan pada saat sebelum serokonversi akut.

ELISA dapat mengenali antigen atau antibodi melalui metode pemeriksaan tidak langsung (*sandwich*), pemeriksaan langsung, metode kompetisi dan *capture assay*. Metode ELISA tidak langsung (*antigen* dan *antibody sandwich* ELISA) merupakan modifikasi ELISA langsung untuk meningkatkan sensitivitas dan spesifisitas. Pada *antibody sandwich* ELISA, antibodi yang diikat pada fase solid (antibodi penangkap) akan mengikat antigen yang terdapat pada spesimen. Langkah berikutnya adalah menambahkan antibodi yang mengenali antigen yang sama dengan antibodi pada fase solid. Antibodi pendeteksi ini akan mengikat antigen yang sebelumnya sudah berikatan dengan antibodi penangkap melalui epitop lain yang terdapat pada antigen. Kemudian ditambahkan antibodi ketiga yang berlabel enzim yang mengenali Fc antibodi kedua dan substrat spesifik terhadap enzim tersebut. Substrat inilah yang dapat menimbulkan perubahan warna.¹⁰

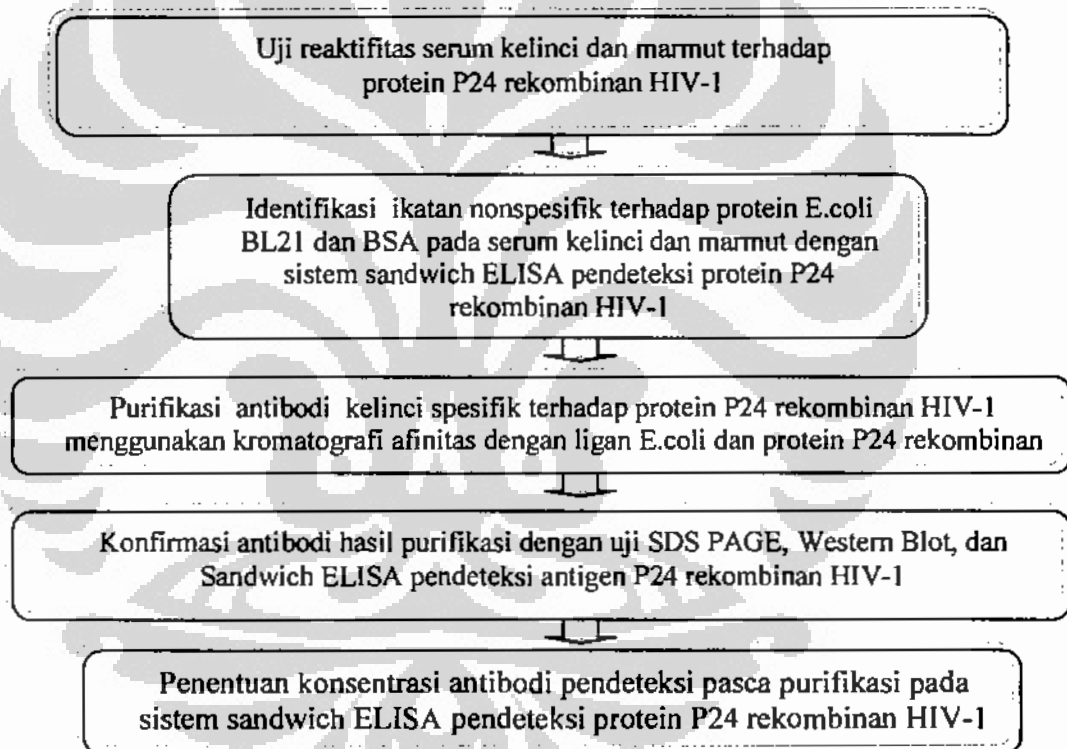
BAB 3

METODOLOGI PENELITIAN

3.1. Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Departemen Mikrobiologi FKUI bulan September 2008 sampai dengan Mei 2009.

3.2. Strategi Penelitian



Gambar 3.1. Alur penelitian

3.3. Bahan dan Cara Kerja

Antigen P24 rekombinan HIV-1 diperoleh dari laboratorium Mikrobiologi FKUI, hasil penelitian Apriliana E, *et al* (2008)¹¹. Pembuatan antigen rekombinan melalui beberapa tahap penelitian, yaitu pengklonaan, ekspresi protein, dan purifikasi dengan *Ni-NTA System*. Antigen rekombinan difusikan dengan peptide pembawa 6x his tag. His tag ini berfungsi dalam purifikasi antigen selanjutnya.

Antibodi terhadap antigen P24 rekombinan HIV-1 diperoleh dari laboratorium dan penelitian yang sama. Antibodi diproduksi di kelinci dan marmut dengan menggunakan teknik *Freund's adjuvant complete* dan *incomplete*.

3.3.1. Uji Reaktivitas Serum Kelinci dan Marmut terhadap Protein P24 Rekombinan HIV-1

3.3.1.1. SDS PAGE dan Western Blot

Tahap awal dilakukan elektroforesis antigen 100 ng dalam 5 μ L PBS 1x (berdasarkan optimasi penelitian terdahulu) dengan metode SDS-PAGE 12%. Sebelum dilakukan elektroforesis, protein ditambahkan 2x larutan dapar pewarna sampel (50 mM Tris HCl, pH 6,8, 2% SDS, 0,1% Bromphenol Blue, 10% Glycerol) yang mengandung 200 mM DTT dalam jumlah yang sama, kemudian dipanaskan pada suhu 95-100 °C selama 5 menit. Dengan pemanasan dan adanya sodium dodecyl sulphate, maka protein akan terurai menjadi bentuk linier dan memiliki muatan negatif. Oleh karena itu protein akan menuju kutub positif. Elektroforesis dilakukan dalam tangki elektroforesis yang mengandung larutan dapar elektroforesis (25 mM Tris, 250 mM Glycine, pH 8,3, 0,1% SDS) pada voltase 100 volt selama kurang lebih 1 jam. Pola pita protein dapat diamati jika gel diwarnai dengan larutan pewarna biru *Coomasie* (90 ml H₂O : metanol [1 : 1], 10 ml asam asetat glasial dan 0,25 gr Brilliant Blue G) dengan penggoyangan pelan selama 10 menit. Warna yang berlebihan kemudian dihilangkan dengan larutan pelepas warna biru *Coomasie* (5% metanol, 7% asam asetat glasial dan 88% H₂O) juga dengan penggoyangan pelan selama kurang lebih satu hari.

Proses transfer dilakukan secara *semi-dry* pada gel yang tidak diwarnai ke membrane *Hybond-C*. Proses transfer dilakukan dengan membuat susunan: kertas *Whatman* - membran *Hybond C* - gel - kertas *Whatman* dari arah kutub negatif ke kutub positif alat *Semi Dry Transfer* (BioRad). Proses transfer berjalan dengan larutan dapar transfer (2,5 gr Glisin, 5,8 gram Tris Base, 200 mL methanol dan H₂O hingga volume akhir 1 L, pH 8.3), pada tegangan 15 volt selama lebih kurang 1 jam.

Dilakukan blok pada kertas nitroselulosa selama 24 jam pada suhu 4°C dengan menggunakan Tween 20 0,1%, gelatin 0,5% dalam 1x PBS. Hal ini bertujuan untuk menghindari terjadinya proses ikatan non spesifik antara antibodi dengan antigen lain.

Tahap pencucian membran menggunakan larutan dapar pencuci dengan PBS-Tween yang berperan dalam membersihkan latar belakang membran sehingga pita spesifik yang dihasilkan dapat terlihat dengan jelas. Serum kelinci dan marmut diencerkan dalam larutan dapar pelarut (0,05% Tween 20 dan gelatin 0,025% dalam 1xPBS). Serum kelinci dan serum marmut yang diencerkan 1/5000 (konsentrasi sesuai dengan optimasi penelitian terdahulu) diberikan pada masing-masing membran yang telah mengandung antigen P24 rekombinan HIV-1. Kemudian ditambahkan antibodi kedua yaitu antibodi anti-IgG kelinci untuk serum kelinci dan antibodi anti-IgG marmut untuk serum marmut. Antibodi kedua tersebut berkonjugasi dengan biotin dan diencerkan dengan pengenceran 1:5000 dalam larutan dapar pengencer. Dilakukan penambahan streptavidin dan larutan substrat yang mengandung 3 mg diaminobenzidin (DAB) dan 5µL H₂O₂ 30% dalam 1xPBS 5mL, kemudian diinkubasi dalam ruang gelap selama 10 menit. Hasil positif akan ditunjukkan dengan pita berwarna merah hasil oksidasi dari diaminobenzidin.

3.3.1.2. ELISA

Uji ELISA dilakukan untuk membuktikan reaktivitas antibodi terhadap antigen p24 rekombinan HIV-1. Sebanyak 5 ng antigen dalam 100 µL larutan dapar pelapis (0,1 M larutan dapar karbonat, pH 9,6: 80 mL stok A [21,2 gram Na₂CO₃ per liter H₂O]+170 mL stok B [16,8 gram NaHCO₃ per liter H₂O]+ 250 ml H₂O)

dilapiskan pada imunoplat (Limbrop/Titertek) selama 16-24 jam pada suhu 4 °C. Besarnya antigen yang dilapiskan pada imunoplat tersebut sama dengan besarnya antigen yang diberikan pada sistem sandwich ELISA yang dikembangkan. Dilakukan blok dengan 200 µL larutan dapar pemblok (BSA 5% dan 0,05% Tween 20 dalam 1x PBS), diinkubasi selama 2 jam pada suhu 37 °C. Larutan dibuang dan serum kelinci ditambahkan dengan pengenceran 1:250 dan marmut dengan pengenceran 1:2000 pada sumur plat yang berbeda. Besarnya pengenceran yang digunakan pada serum marmut dan kelinci berdasarkan besarnya pengenceran yang digunakan dalam sistem sandwich ELISA yang dikembangkan. Pengenceran dilakukan dengan larutan dapar pelarut (0,25% BSA dan 0,05% Tween 20 dalam 1xPBS). Kontrol negatif dibuat dengan tanpa penambahan serum. Inkubasi selama 1 jam pada suhu 37 °C, plat kemudian dicuci dengan 200 µL larutan dapar pencuci (0,05% Tween 20 dalam 1xPBS) sebanyak 5X pencucian. Seratus mikroliter antibodi berlabel biotin yang diencerkan 1:5000 dalam larutan dapar pelarut, yang spesifik terhadap antibodi kelinci diberikan pada sumur yang diberikan serum kelinci, sedangkan antibodi berlabel biotin yang spesifik terhadap antibodi marmut diberikan pada sumur yang diberikan serum marmut. Plat dicuci. Kemudian dilakukan penambahan streptavidin berkonjugasi horseradish peroxidase (HRPO-streptavidin), Plat diinkubasi selama 1 jam pada suhu 37 C. Plat dicuci. Dua ratus µL larutan substrat (8mg OPD dalam 20 mL 0,05 M dapar phosphat citrate pH 5,0-5,2, 8 µL 30% H₂O₂) ditambahkan, diinkubasi 10 dan 20 menit pada suhu ruang. Absorbansi dibaca pada panjang gelombang 450 nm menggunakan *Microplate Reader 550*, Biorad.

3.3.2. Identifikasi Ikatan Non Spesifik terhadap Protein *E.coli* BL21 dan BSA pada Serum Kelinci dan Marmut dengan Sistem Sandwich ELISA Pendeteksi Protein P24 Rekombinan HIV-1

3.3.2.1. Sandwich ELISA

Imunoplat (Limbrop/Titertek) dilapisi dengan serum marmut pasca imunisasi antigen P24 rekombinan HIV-1 dengan konsentrasi 1:2000 dalam larutan dapar pelapis (larutan mengandung 0,1 M dapar karbonat, pH 9,6) sebanyak 100 µL setiap

sumur plat. Plat diinkubasi pada suhu 4°C selama 24 jam. Larutan dapar pemblok (BSA 5% dalam PBS 1x) ditambahkan sebanyak 200 µL setiap sumur tersebut, kemudian diinkubasi selama 2 jam pada suhu 37°C. Lima ng antigen P24 rekombinan HIV-1 dalam 100 µL larutan dapar pelarut ditambahkan di setiap sumur. Plat diinkubasi pada suhu 37°C selama 1 jam. Plat kemudian dicuci dengan larutan dapar pencuci (0,05 % Tween 20 dalam PBS 1x) 200 µL/sumur sebanyak 5 kali pencucian. Serum kelinci pasca imunisasi antigen P24 rekombinan HIV-1 dengan konsentrasi 1:250 dalam larutan dapar pelarut (BSA 0,25%, 0,05% Tween 20 dalam PBS 1x) ditambahkan sebanyak 100µL tiap sumur. Plat diinkubasi selama 1 jam pada suhu 37°C. Plat dicuci dengan larutan dapar pencuci sebanyak 5 kali pencucian. Antibodi anti IgG kelinci yang berlabel biotin dengan konsentrasi 1:5000 dalam larutan dapar pelarut ditambahkan sebanyak 100µL tiap sumur. Plat diinkubasi selama 1 jam pada suhu 37°C. Plat dicuci dengan larutan dapar pencuci sebanyak 5 kali pencucian. Streptavidin ditambahkan ke dalam plat dengan pengenceran 3:1000 dalam dapar pelarut sebanyak 100µL tiap sumur. Plat diinkubasi selama 1 jam pada suhu 37°C. Plat dicuci dengan larutan dapar pencuci sebanyak 5 kali pencucian. Dua ratus µL substrat (8mg OPD dalam 20 mL 0,05 larutan dapar fosfat-sitrat, 8µL 30% H₂O₂) ditambahkan tiap sumur. Plat diinkubasi selama 10 dan 20 menit pada suhu ruangan. Absorbansi dibaca pada menit ke-10 dan 20 dengan *Microplate Reader* 550, Biorad pada panjang gelombang 450 nm.

3.3.2.2. Preparasi Lisat *E.coli*

E.coli BL21 ditumbuhkan pada 100 ml agar LB (1 gram NaCl, 1gram tryptone, 0,5 gram yeast extract, 1,5 gram agar). Goyang campuran *E.coli* selama 16 jam pada suhu 37 °C. Kemudian dilakukan aliquot 1 ml campuran *E.coli*. Campuran disentrifugasi dengan kecepatan 6000 rotasi per menit selama 2 menit. Supernatan dibuang, pelet diresuspensi dalam 3 mL PBS 1x. Larutan divorteks dan diletakkan pada permukaan es. Larutan disonikasi dengan alat sonikator beroutput 2 Volt, input 6 Volt, selama 30 detik, berhenti selama 10 detik sampai 10 kali. Larutan disentrifugasi

dengan kecepatan 8000 putaran per menit selama 15 menit. Supernatan dibuang, pelet disimpan pada suhu -80 °C.

3.3.3. Purifikasi Antibodi Poliklonal

3.3.3.1. Purifikasi Antibodi Poliklonal dengan Menggunakan Kromatografi Afinitas

3.3.3.1.1. Purifikasi Antibodi Poliklonal dengan Ligan *E.coli*

Sebagai matriks digunakan Cn-Br Sepharose Activated For Fast Flow (Pharmacia) sebanyak 0,286 gram. Cn-Br Sepharose ditimbang, kemudian dicampurkan dengan 1 mL larutan 1mM HCL dingin dan diinkubasi di atas permukaan es selama 15 menit. Larutan ini dicuci dengan sentrifugasi 2000 rpm pada suhu ruang selama menggunakan 19 mL 1mM HCL, sebanyak 3 kali pencucian. Pelet *E.coli* BL-21 yang telah ditambahkan PBS 1x sebanyak 1 mL dilarutkan dalam 0,0572 mL larutan perekat ligan (0,1 M NaHCO₃ dan 0,5 M NaCl, pH 8,3). Campuran ligan *E.coli* tersebut ditambahkan ke dalam medium, dan digoyang selama 1 jam pada suhu ruang. Larutan dicuci dengan 5 mL larutan dapar perekat ligan. Setelah itu dilakukan blok dengan 1 mL larutan pemblok (0,1 M Tris HCl, pH 8). Campuran diinkubasi pada suhu ruangan selama 2 jam. Campuran dicuci dengan 5 mL larutan dapar natrium asetat (0,1 M dapar asetat dan 0,5 M NaCl, pH 4) dan 5 mL larutan Tris HCL (0,1 M Tris HCl, 0,5 M NaCl, pH 8) secara bergantian sebanyak 3 kali pencucian. Campuran yang telah dicuci di pindahkan ke kolom *syringe* 5 mL yang telah diberi penyaring 0,22 µm di ujung bawahnya. Serum kelinci dilewatkan sebanyak 1 ml melalui filter 0,22 µm ke medium yang ada pada kolom. Larutan yang keluar dari kolom ditampung. Kolom dicuci dengan larutan dapar pengikat (75 mM Tris HCl , pH 8). Larutan yang keluar dari kolom ditampung. Tiga mL larutan dapar pengelusi (100 mM glicin HCl dan 0,5 M NaCl, pH 2,7) dilewatkan ke dalam kolom. Larutan yang keluar dari kolom ditampung menggunakan tabung yang telah berisi 0,5 mL 0,1 M Tris HCl, pH 8.

3.3.3.1.2. Purifikasi Antibodi dengan Ligan P24 rekombinan HIV-1

Setelah dilakukan preparasi CnBr dan pencucian, larutan protein P24 rekombinan HIV-1 sebanyak 100 μ L dilarutkan dengan 0,0572 mL larutan perekat ligan (0,1 M NaHCO₃, 0,5 M NaCl, pH 8,3). Campuran ligan P24 rekombinan HIV-1 tersebut ditambahkan ke dalam medium, dan digoyang selama 1 jam pada suhu ruang. Campuran dicuci dengan 5 mL larutan perekat ligan, kemudian diblok dengan 1 mL larutan pemblok (0,1 M Tris HCl, pH 8). Campuran diinkubasi pada suhu ruangan selama 2 jam. Campuran dicuci dengan 5 mL larutan dapar natrium asetat (0,1 M dapar asetat dan 0,5 M NaCl, pH 4) dan 5 mL larutan Tris HCL (0,1 M Tris HCl, 0,5 M NaCl, pH 8) bergantian sebanyak 3 kali pencucian. Campuran yang telah dicuci di pindahkan ke kolom yang telah diberi penyaring 0,22 μ m di ujung bawahnya. Enam ratus μ L larutan tampungan pasca melewati serum kelinci ke kolom yang mengandung ligan E.coli (*flow through* kolom ligan E.coli) dilewatkan melalui filter 0,22 μ m ke medium yang ada dalam kolom. Larutan yang keluar dari kolom ditampung. Kolom dicuci dengan larutan dapar pengikat (75 mM Tris HCl , pH 8). Larutan yang keluar dari kolom ditampung. Tiga mL larutan dapar pengelusi (100 mM glycine HCl dan 0,5 M NaCl, pH 2,7) dilewatkan ke dalam kolom. Larutan yang keluar dari kolom ditampung menggunakan tabung yang telah berisi 0,5 mL 0,1 M Tris HCl, pH 8.

3.3.4. Konfirmasi Antibodi Hasil Purifikasi

3.3.4.1. SDS PAGE

Hasil purifikasi dikonfirmasi dengan menggunakan elektroforesis gel poliakrilamid 10 %. Sampel yang diperiksa adalah serum kelinci setelah imunisasi dengan protein P24 rekombinan HIV-1 tetapi belum dipurifikasi, serum kelinci setelah dilewatkan pada kolom purifikasi dengan ligan P24 rekombinan HIV-1 (*flow-through*), larutan tampungan dapar pengikat pada kolom purifikasi dengan ligan P24 rekombinan HIV-1 (hasil pencucian dengan dapar pencuci), dan hasil elusi kolom purifikasi dengan ligan P24 rekombinan HIV-1 yang telah dipekatkan menggunakan etanol absolut. Setiap sampel sebanyak 10 μ L dicampur dengan 2x larutan dapar SDS

pewarna sampel dalam jumlah yang sama dengan jumlah sampel. Sampel dipanaskan selama 5 menit pada suhu 100°C.

Agar yang telah dielektroforesis diwarnai menggunakan larutan biru Comassie. Penghilangan warna yang melekat di agar dilakukan dalam 24 jam dengan merendam agar tersebut dalam larutan penghilang warna, dan digoyang pada suhu ruangan.

3.3.4.2. Sandwich ELISA

Imunoplat dilapisi antibodi marmut dengan pengenceran 1/2000. Kemudian plat diblok dengan larutan dapat pemblok. Protein P24 rekombinan HIV-1 dengan konsentrasi 50 ng/mL dalam larutan dapat pelapis sebanyak 100µL/sumur. Sebagai antibodi pendeteksi digunakan serum kelinci sebelum imunisasi P24 rekombinan HIV-1, serum kelinci setelah imunisasi, serum kelinci setelah imunisasi pasca purifikasi dengan kolom ligan P24 rekombinan HIV-1. Masing-masing dengan konsentrasi 1:250 dalam 100 µL larutan dapat pelarut. Langkah kerja berikutnya sama dengan langkah kerja sandwich ELISA sebelumnya. Antibodi hasil purifikasi diukur pula reaktivitasnya terhadap antigen *E.coli* menggunakan sandwich ELISA.

3.3.4.3. Western Blot

Elektroforesis dilakukan dengan metode SDS-PAGE terhadap protein P24 rekombinan HIV-1 dengan menggunakan agar berkonsentrasi 12%. Konsentrasi protein 100 ng dalam 5 µL PBS 1x. Sampel tersebut dilarutkan dalam 2x larutan dapat pewarna sampel sebanyak 5 µL. Setelah dialiri listrik 100 volt selama 1 jam, protein dalam gel dipindahkan ke kertas nitroselulosa. Kertas nitroselulosa yang telah mengandung protein diblok dengan larutan dapat pemblok yang mengandung 0,5% gelatin dan 0,1% Tween dalam larutan 1X PBS selama 24 jam pada suhu 4°C.

Kertas nitroselulosa dicuci dengan larutan dapat pencuci (500µL Tween dalam 500 mL 1XPBS). Serum kelinci prepurifikasi dan pasca purifikasi ditambahkan ke dalam kertas nitroselulosa. Terlebih dahulu serum tersebut dilarutkan dalam 5 mL larutan dapat pelarut yang mengandung larutan dapat pemblok dan

1XPBS dengan perbandingan yang sama sehingga serum tersebut berkonsentrasi 1/5000. Kertas nitroselulosa dan serum digoyang pada suhu ruangan selama 1 jam. Setelah itu kertas nitroselulosa dicuci dengan menggunakan larutan dapar pencuci. Anti- antibodi kelinci yang mengandung biotin ditambahkan dengan konsentrasi 1/5000 dalam 5 mL larutan dapar pelarut dan digoyang pada suhu kamar selama 1 jam. Sebanyak 5 mikroliter streptavidin dalam 5 mL larutan dapar pelarut ditambahkan dan digoyang pada suhu kamar selama 1 jam. Substrat yang mengandung 3 mg DAB, 5 μ L H₂O₂ 30% dalam 5 mL 1XPBS, inkubasi dalam ruang gelap selama 15 menit.

3.3.4.4. Presipitasi Protein

Protein hasil purifikasi yang menunjukkan pita tipis pada agar elektroforesis dengan pewarnaan larutan comassie biru dipresipitasi dengan larutan etanol absolut. Sampel protein diambil sebanyak 350 μ L, ditambahkan 1000 μ L etanol absolut dingin. Larutan tersebut dimasukkan ke dalam pendingin dengan suhu -20°C selama 24 jam. Larutan disentrifugasi pada kecepatan 12000 rpm selama 30 menit. Supernatan dibuang dan pelet dikeringkan. Pelet dipersiapkan untuk elektroforesis selanjutnya.

3.3.5. Penentuan konsentrasi antibodi pendeteksi pasca purifikasi pada sistem sandwich ELISA pendeteksi protein P24 rekombinan HIV-1

Uji sandwich ELISA dilakukan dengan menggunakan eluen sebagai antibodi pendeteksi. Seluruh eluen baik dari kolom dengan ligan P24 rekombinan HIV-1 maupun dengan ligan E.coli direaksikan dengan antigen P24 rekombinan HIV-1 dengan pengenceran 1/50.

Eluen hasil kolom dengan ligan P24 rekombinan direaksikan dengan berbagai konsentrasi pengenceran, yaitu: 1/500, 1/250, 1/100, 1/50, 1/25, 1/10 dan yang tidak diencerkan. Nilai absorbansi yang terbentuk dipilih yang menunjukkan nilai tertinggi.

BAB 4

HASIL DAN PEMBAHASAN

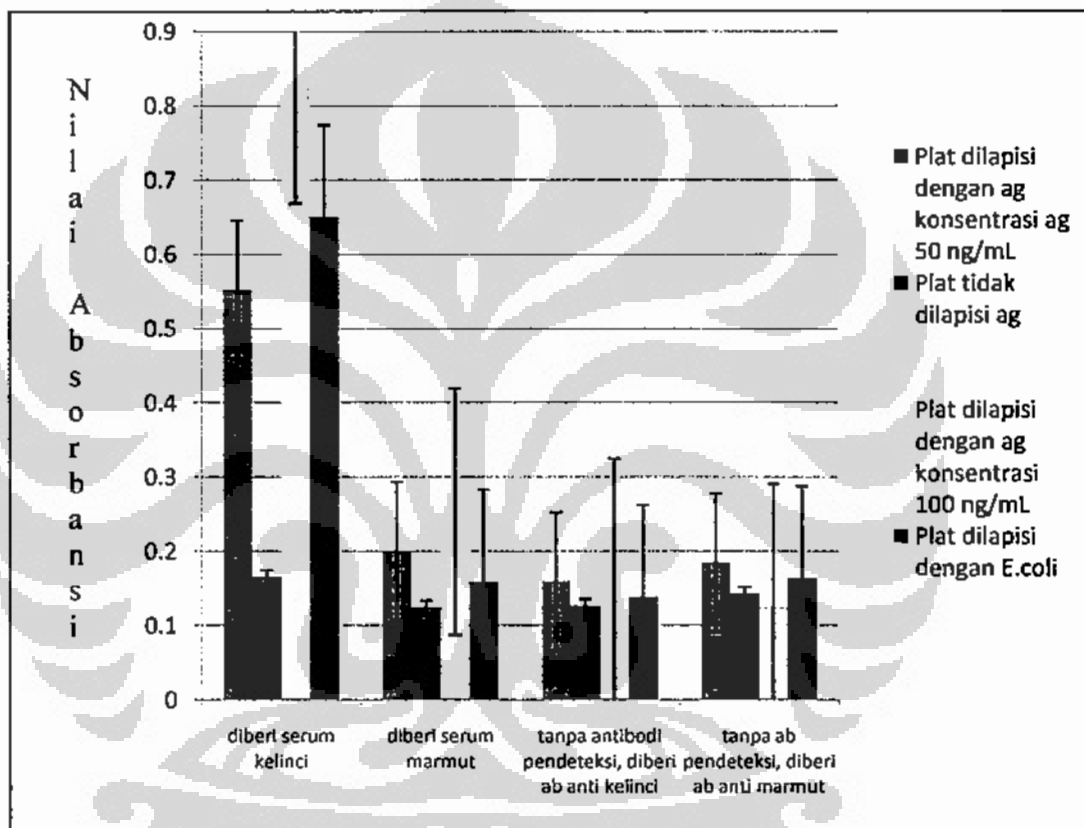
4.1. Uji Reaktivitas Serum Kelinci dan Marmut terhadap Protein P24 Rekombinan HIV-1

Reaktivitas antibodi terhadap antigen protein fusi his-tag P24 rekombinan HIV-1 (selanjutnya disebut sebagai protein P24 rekombinan HIV-1), diperoleh dengan uji western blot. Hasil uji *western blot* masing-masing ditunjukkan pada gambar 4.1, terbentuk pita yang setara dengan berat molekul 24 kDa pada serum marmut dan kelinci pasca imunisasi yang direaksikan dengan antigen P24 rekombinan HIV-1. Hal ini menunjukkan antibodi terhadap protein P24 rekombinan HIV-1 yang terdapat dalam serum marmut dan kelinci masih reaktif terhadap antigen tersebut.



Gambar 4.1. Uji reaktivitas antibodi marmut dan kelinci hasil imunisasi yang diencerkan menjadi konsentrasi 1/5000 dengan antigen P24 rekombinan HIV-1 dengan teknik western blot. Lajur 1. serum kelinci betina, lajur 2. serum kelinci jantan, lajur 3. serum marmut betina, lajur 4. serum marmut jantan, lajur 4. kontrol negatif, lajur 5. marka protein.

Pengujian reaktivitas antibodi dilakukan pula terhadap antigen protein P24 rekombinan HIV-1 dengan menggunakan teknik ELISA dengan konsentrasi antigen, serum kelinci dan serum marmut berdasarkan optimasi penelitian terdahulu.¹¹ Hasil yang diperoleh adalah serum kelinci dan marmut masih reaktif terhadap antigen rekombinan yang dilapis pada plat ELISA, seperti yang tertera pada gambar 4.2.



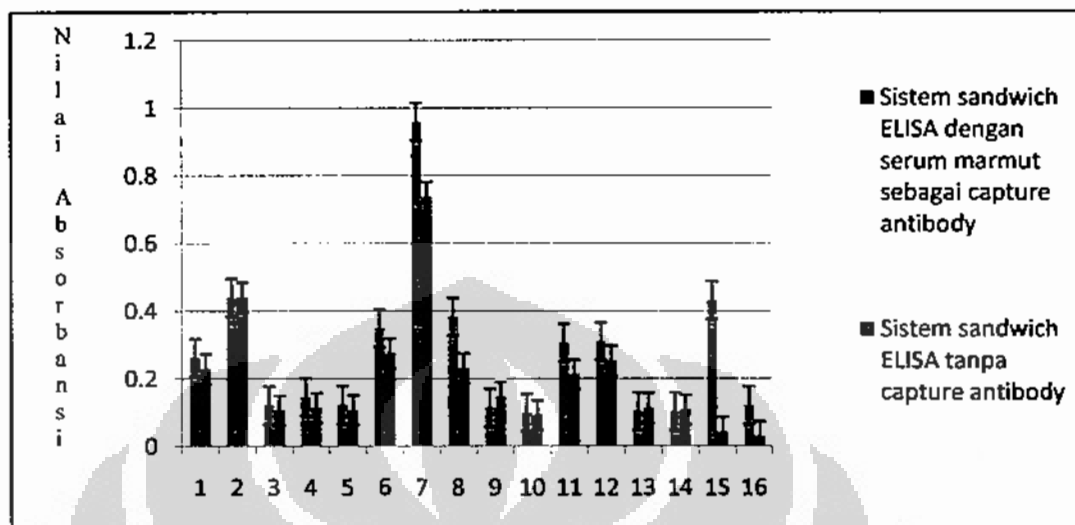
Gambar 4.2. Uji reaktivitas serum kelinci dan marmut dengan antigen P24 rekombinan HIV-1 dengan teknik ELISA. Poligon berwarna biru menunjukkan plat dilapisi antigen dengan konsentrasi 50 ng/mL, poligon berwarna merah menunjukkan plat tidak dilapisi antigen, poligon berwarna hijau menunjukkan plat dilapisi antigen dengan konsentrasi 100 ng/mL, poligon berwarna ungu menunjukkan plat dilapisi antigen *E.coli*

Pada uji ini juga dilakukan pelapisan plat ELISA dengan menggunakan antigen *E.coli* BL21 (gambar 4.2 poligon ungu). Konsentrasi *E.coli* BL21 disesuaikan dengan konsentrasi masing-masing serum. Konsentrasi *E.coli* BL21 yang digunakan adalah 1:250 untuk serum kelinci, sedangkan untuk serum marmut digunakan

1:2000. Diperoleh hasil bahwa serum kelinci reaktif terhadap antigen *E.coli* (gambar 4.2 poligon ungu-diberi serum kelinci), sedangkan serum marmut reaktifitasnya terhadap *E.coli* BL21 tidak jauh berbeda dengan kontrol negatif (gambar 4.2 poligon ungu-diberi serum marmut). Hal ini mendukung dugaan serum kelinci dan marmut mengandung antibodi terhadap protein *E.coli* BL21 karena ekspresi protein rekombinan HIV-1 dilakukan pada *E.coli* BL21. Serum kelinci menunjukkan reaktifitas yang tinggi terhadap protein *E.coli*, tetapi tidak demikian dengan serum marmut. Hasil ini menjadi data yang penting untuk proses purifikasi antibodi dengan menggunakan kromatografi afinitas.

4.2. Identifikasi Ikatan Non Spesifik terhadap Protein *E.coli* BL21 dan BSA pada Serum Kelinci dan Marmut dengan Sistem Sandwich ELISA Pendeteksi Protein P24 Rekombinan HIV-1

Serum marmut digunakan sebagai antibodi penangkap dan serum kelinci digunakan sebagai antibodi pendeteksi pada sistem sandwich ELISA yang dikembangkan. Pada gambar 4.3 (poligon 2 biru) terlihat bahwa nilai absorbansi sistem dengan antigen lebih tinggi dari nilai absorbansi sistem tanpa antigen (kontrol negatif) (poligon 1 biru). Hal ini terjadi karena sistem ini reaktif terhadap antigen P24 rekombinan HIV-1



Gambar 4.3. Uji Sandwich ELISA untuk mencari ikatan non spesifik yang mempengaruhi absorbansinya. 1.Tanpa diberikan antigen rp24 HIV 1 (kontrol negatif), 2.Diberikan antigen rp24 HIV 1 (kontrol positif), 3.Tanpa diberikan serum kelinci sebagai antibodi pendeteksi, 4.Tanpa diberikan antigen rp24 HIV 1 dan serum kelinci sebagai antibodi pendeteksi, 5.Tanpa diberikan antigen rp24 HIV 1, serum kelinci sebagai antibodi pendeteksi, dan anti IgG kelinci, 6.Serum kelinci diinkubasi dengan *E.coli* (konsentrasi 1/250) selama 1 jam, 7.Larutan dapar pemblok BSA 5% diinkubasi dengan *E.coli* (konsentrasi 5%) selama 1 jam, 8.Diberikan serum manusia HIV positif menggantikan antigen rp24 HIV 1, 9.Tanpa diberikan serum manusia HIV positif menggantikan antigen rp24 HIV 1, dan serum kelinci sebagai antibodi pendeteksi, 10.Tanpa diberikan serum manusia HIV positif menggantikan antigen rp24 HIV 1, serum kelinci sebagai antibodi pendeteksi, dan anti IgG kelinci, 11.Diberikan serum manusia HIV negatif menggantikan antigen rp24 HIV 1, 12.Tanpa diberikan serum manusia HIV negatif menggantikan antigen rp24 HIV 1, 13.Tanpa diberikan serum manusia HIV negatif menggantikan antigen rp24 HIV 1, serum kelinci sebagai antibodi pendeteksi, 14.Tanpa diberikan serum manusia HIV negatif menggantikan antigen rp24 HIV 1, serum kelinci sebagai antibodi pendeteksi, dan anti IgG kelinci, 15.Tidak diberikan larutan dapar pemblok BSA 5% (poligon berwarna biru). Sumur ELISA tidak digunakan (poligon berwarna merah), 16.Sumur ELISA hanya dilapisi serum marmut tanpa diberikan perlakuan lainnya (poligon berwarna biru). Sumur ELISA tidak digunakan (poligon berwarna merah)

Gambar 4.3. memperlihatkan hasil bahwa nilai absorbansi pada sistem tanpa serum marmut sebagai antibodi penangkap tidak berbeda dengan nilai absorbansi pada sistem dengan serum marmut (poligon 2 merah). Hal ini juga ditemui pada perlakuan lainnya yang tidak menggunakan serum marmut (poligon 1-5 merah). Berdasarkan hal tersebut diperoleh kesimpulan sementara bahwa serum marmut sebagai antibodi penangkap kurang mempengaruhi kerja sistem sandwich ELISA. Hal ini dapat terjadi karena perbedaan konsentrasi yang digunakan oleh serum marmut dan kelinci dalam sistem ini.

Berbeda dengan serum marmut, serum kelinci memiliki peran yang penting dalam sistem. Penghilangan keberadaan serum kelinci menurunkan nilai absorbansi sistem secara bermakna (gambar 4.3 poligon 3,4,5).

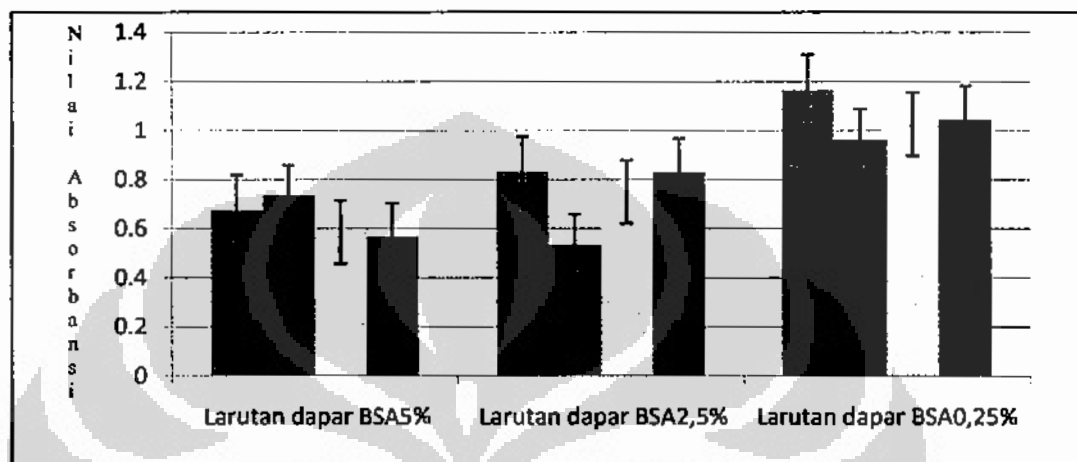
Nilai absorbansi sistem dengan perlakuan serum kelinci yang diinkubasi dengan *E.coli* menunjukkan adanya penurunan dibandingkan dengan sistem tanpa inkubasi (gambar 4.3 poligon 6). Atas dasar hal ini, diambil kesimpulan sementara bahwa pada serum kelinci terdapat antibodi terhadap protein *E.coli* yang jika diberikan antigennya maka terjadi proses netralisasi. Oleh karena itu, jika serum kelinci diberikan pada sistem yang menggunakan serum marmut yang merupakan antibodi poliklonal sebagai antibodi penangkap dan antigen rekombinan hasil ekspresi di bakteri *E.coli*, nilai absorbansi yang ditimbulkan akan lebih rendah jika dibandingkan dengan sistem tanpa inkubasi serum kelinci sebagai antibodi pendeteksi dengan *E.coli*.

Nilai absorbansi uji dengan dapar pemblok yang diinkubasi *E.coli* menunjukkan peningkatan dibandingkan kontrol positif (gambar 4.3 poligon 7). Hal ini menunjukkan pula adanya pengaruh *E. coli* pada serum marmut dan kelinci. Serum marmut yang terdiri atas antibodi poliklonal dapat menangkap protein *E.coli* pada larutan pemblok dan protein tersebut dapat dideteksi oleh serum kelinci yang terdiri atas antibodi poliklonal juga. Kesimpulan ini juga didukung oleh perlakuan tanpa serum marmut yang diberi larutan pemblok yang mengandung *E.coli* (gambar 4.3 poligon 7 merah). Pada perlakuan ini terdapat penurunan nilai absorbansi.

Dari gambar 4.3 dapat diambil kesimpulan bahwa serum kelinci merupakan faktor yang utama penentu nilai absorbansi sistem sandwich ELISA. Oleh karena itu dilakukan beberapa pengujian terhadap serum kelinci. Pengujian tersebut bertujuan mengidentifikasi ikatan nonspesifik yang terbentuk dari ikatan antibodi yang terdapat pada serum kelinci dengan antigen selain protein rekombinan P24 HIV-1.

Perlakuan berikutnya adalah inkubasi serum kelinci dengan larutan dapar pelarut yang mengandung BSA dengan konsentrasi 5% dan 2,5% . Waktu inkubasi yang dilakukan adalah 1 jam, 2 jam dan 3 jam. Sebagai pembanding terdapat juga serum kelinci yang diberi larutan dapar pelarut tetapi tidak diinkubasi. Kemudian

dilakukan pengukuran nilai absorbansi dengan sistem sandwich ELISA yang akan dikembangkan. Tujuan dari perlakuan ini untuk mengetahui pengaruh BSA terhadap nilai absorbansi sistem ELISA. Hasil perlakuan ini dapat dilihat pada gambar 4.4.

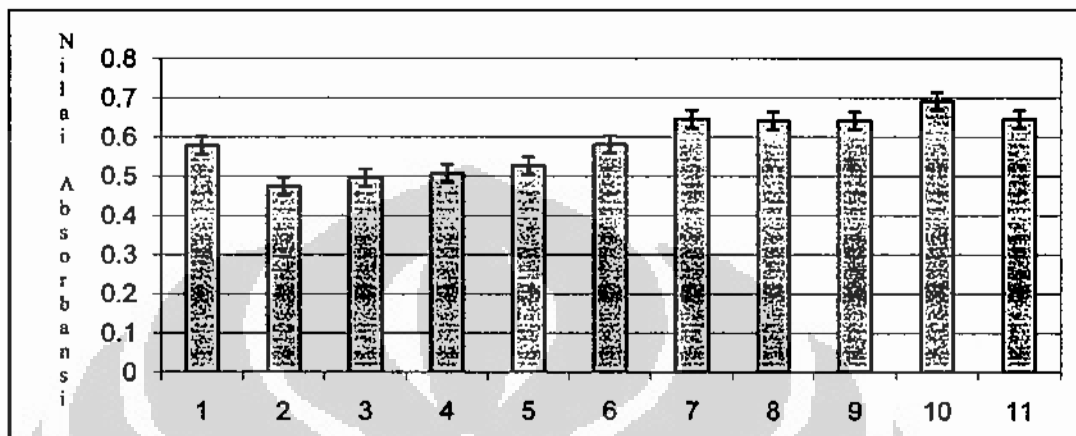


Gambar 4.4. Uji Sandwich ELISA untuk mengetahui perbedaan waktu inkubasi serum kelinci dengan larutan dapar pelarut yang mengandung BSA dengan berbagai konsentrasi. Poligon berwarna biru menunjukkan serum kelinci tidak diinkubasi dengan dapar pelarut, poligon berwarna merah menunjukkan serum kelinci diinkubasi 1 jam, poligon berwarna hijau diinkubasi 2 jam, poligon berwarna ungu diinkubasi 3 jam.

Perbedaan konsentrasi BSA yang digunakan pada larutan pelarut serum kelinci menunjukkan perbedaan nilai absorbansi. Semakin tinggi konsentrasi BSA yang digunakan semakin rendah nilai absorbansi yang dihasilkan. Hal ini menunjukkan ada pengaruh langsung antara BSA dengan serum kelinci terhadap perubahan nilai absorbansi yang dihasilkan. Namun waktu inkubasi tidak mempengaruhi nilai absorbansi yang dihasilkan.

Untuk mengetahui adanya penurunan sinyal dilakukan juga inkubasi 1 jam serum kelinci dengan antigen *E.coli* BL21 yang diencerkan serial. Hal ini dilakukan berdasarkan asumsi bahwa antigen yang digunakan untuk induksi antibodi kelinci maupun antigen yang digunakan dalam sistem sandwich ELISA merupakan antigen P24 rekombinan yang berpotensi terkontaminasi oleh protein *E.coli*. Hasil dari pengujian ini dapat dilihat pada gambar 4.5. Semakin encer protein *E.coli*, nilai absorbansi yang dihasilkan semakin tinggi. Hal ini mungkin disebabkan karena antigen *E. coli* sedikit yang berikatan dengan antibodinya pada serum sehingga ikatan

non spesifik yang terbentuk antara *E. coli* yang ditangkap oleh antibodi penangkap dengan antibodi *E.coli* dalam serum kelinci masih banyak pada sistem sandwich ELISA. Oleh karena itu terjadi nilai absorbansi sistem masih tinggi.



Gambar 4.5. Uji sandwich ELISA untuk mengetahui pengaruh konsentrasi protein *E.coli* BL21 dalam pelarut serum kelinci terhadap terbentuknya sinyal yang ditimbulkan dalam sistem tersebut untuk mendeteksi antigen P24 rekombinan HIV-1. Poligon 1.Serum kelinci dengan konsentrasi 1/500 diinkubasi *E.Coli* dengan konsentrasi 50% dalam 200 μ L larutan PBS 1x, poligon 2.Serum kelinci dengan konsentrasi 1/500 diinkubasi *E.Coli* dengan konsentrasi 25% dalam 200 μ L larutan PBS 1x, poligon 3.Serum kelinci dengan konsentrasi 1/500 diinkubasi *E.Coli* dengan konsentrasi 12,5% dalam 200 μ L larutan PBS 1x, poligon 4.Serum kelinci dengan konsentrasi 1/500 diinkubasi *E.Coli* dengan konsentrasi 6,25% dalam 200 μ L larutan PBS 1x, poligon 5.Serum kelinci dengan konsentrasi 1/500 diinkubasi *E.Coli* dengan konsentrasi 3,125% dalam 200 μ L larutan PBS 1x, poligon 6.Serum kelinci dengan konsentrasi 1/500 diinkubasi *E.Coli* dengan konsentrasi 1,5625% dalam 200 μ L larutan PBS 1x, poligon 7.Serum kelinci dengan konsentrasi 1/500 diinkubasi *E.Coli* dengan konsentrasi 0,78125% dalam 200 μ L larutan PBS 1x, poligon 8.Serum kelinci dengan konsentrasi 1/500 diinkubasi *E.Coli* dengan konsentrasi 0,390625% dalam 200 μ L larutan PBS 1x, poligon 9.Serum kelinci dengan konsentrasi 1/500 diinkubasi *E.Coli* dengan konsentrasi 0,1953125% dalam 200 μ L larutan PBS 1x, poligon 10.Serum kelinci dengan konsentrasi 1/500 diinkubasi *E.Coli* dengan konsentrasi 0,09976563% dalam 200 μ L larutan PBS 1x, poligon 11.Serum kelinci dengan konsentrasi 1/500 diinkubasi *E.Coli* dengan konsentrasi 0,0488281% dalam 200 μ L larutan PBS 1x.

4.3. Purifikasi Antibodi Poliklonal

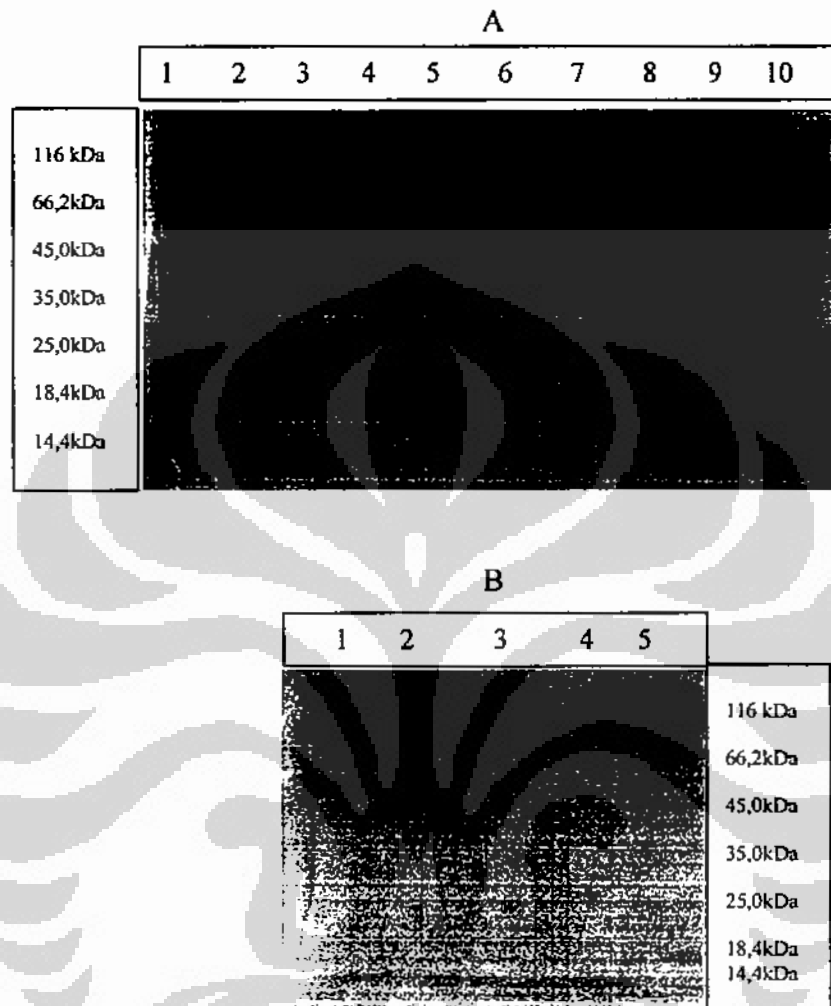
Purifikasi antibodi dilakukan terhadap serum kelinci berdasarkan hasil identifikasi ikatan nonspesifik yang telah dilakukan sebelumnya. Purifikasi dengan menggunakan metode afinitas dipilih untuk mendapatkan antibodi yang spesifik terhadap protein P24 rekombinan. Purifikasi ini menggunakan CnBr *sepharose activated for fast flow* (Pharmacia). Purifikasi menggunakan 2 kolom dengan ligan yang berbeda. Pada kolom pertama diikatkan ligan *E.coli* BL21 pasca sonikasi,

sedangkan pada kolom kedua diikatkan ligan protein P24 rekombinan. Dari 1 ml serum kelinci yang dilewatkan pada kolom pertama, diperoleh 700 μ L serum kelinci yang dapat dilewatkan kembali ke dalam kolom kedua. Hanya 600 μ L saja yang kemudian dilewatkan ke dalam kolom kedua, sisanya disimpan pada suhu -80°C . Kolom pertama dan kedua dielusi menggunakan larutan glycine HCl, pH 2,7. Dari hasil purifikasi ini diperoleh 2,5 mL eluen dari kolom pertama, dan $5 \times 2,5$ mL eluen dari kolom kedua. Setiap tabung hasil elusi disimpan dalam 500 μ L Tris HCl, pH 8,0.

Eluen dari kolom pertama dan kedua dialiquot berdasarkan waktu inkubasi larutan dapar pengelusi dalam kolom. Tabung pertama hasil inkubasi 1 jam (inkubasi pertama), tabung kedua hasil inkubasi 2 jam setelah inkubasi pertama (inkubasi kedua), tabung ketiga hasil inkubasi 18 jam setelah inkubasi kedua (inkubasi ketiga), tabung keempat hasil inkubasi 1 jam setelah inkubasi ketiga (inkubasi keempat), dan tabung kelima hasil inkubasi 2 jam setelah inkubasi keempat (inkubasi kelima).

4.4. Konfirmasi Antibodi Hasil Purifikasi

Kolom kedua yang mengandung ligan P24 rekombinan HIV-1 yang telah dilewati serum kelinci dielusi untuk memperoleh antibodi poliklonal yang spesifik terhadap protein P24 rekombinan HIV-1. Sebelum dilakukan elusi, dilakukan optimasi pencucian kolom. Hasilnya diperoleh bahwa proses pencucian yang dilakukan pada kolom ini sebanyak 6×5 mL. Setelah dipastikan air cucian tidak menunjukkan adanya pita pada uji elektroforesis SDS PAGE (gambar 4.6B), dilakukan elusi dengan menggunakan larutan glycine HCl, pH 2,7.

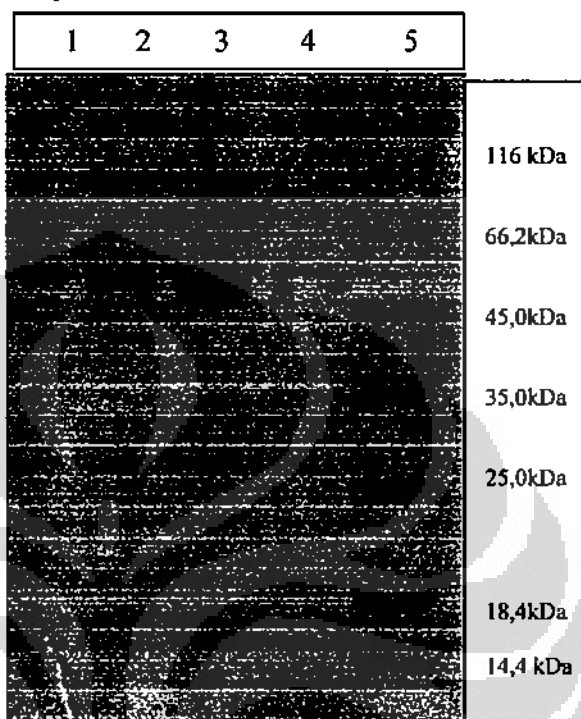


Gambar 4.6. A. Hasil SDS PAGE Flow trough kolom P24 rekombinan HIV-1 dan cucian pertama. Lajur 1. Marka protein, lajur 2. Serum kelinci pre purifikasi, lajur 3. Flow through ligan P24, lajur 4-10. Hasil pencucian 3 kali 5 mL pertama.

B. Hasil SDS PAGE cucian terakhir kolom P24 rekombinan HIV-1. Lajur 1. 490 μ L pencucian 5 mL kelima kolom ligan P24 rekombinan HIV-1, 2. 100 μ L pencucian 5 mL kelima kolom ligan P24 rekombinan HIV-1, 3. 490 μ L pencucian 5 mL keenam kolom ligan P24 rekombinan HIV-1, 4. 100 μ L pencucian 5 mL keenam kolom ligan P24 rekombinan HIV-1, 5. Marka protein

Hasil purifikasi antibodi dikonfirmasi dengan menggunakan elektroforesis, Western Blot dan ELISA. Dari konfirmasi keberadaan antibodi dengan pewarnaan Comassie Blue SDS PAGE dan presipitasi protein dengan etanol absolut, diperoleh bahwa hasil purifikasi antibodi kelinci di kolom dengan ligan P24 rekombinan HIV-1

sudah cukup murni. Hal ini terbukti dengan terbentuknya pita-pita tipis antara 45 kDa dan 116 kDa (gambar 4.7 lajur 1-4).

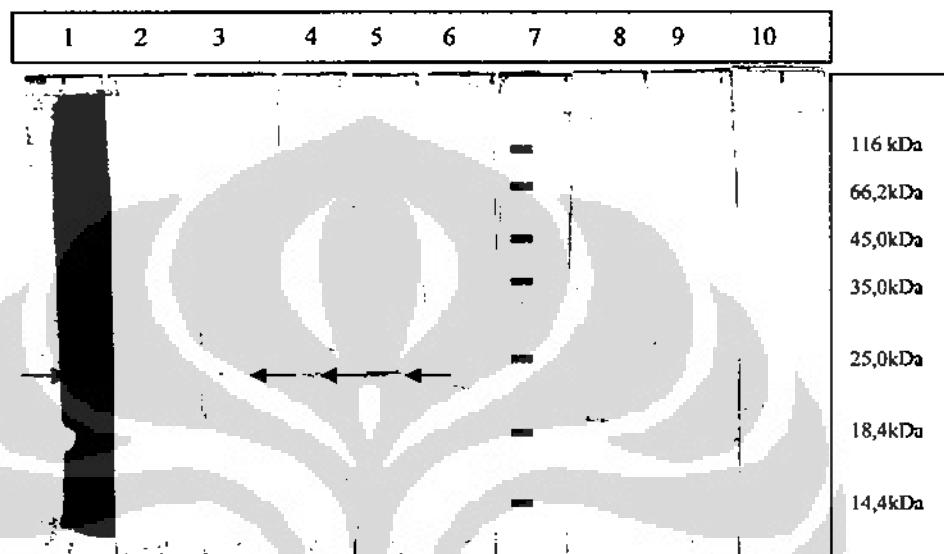


Gambar 4.7. Hasil SDS PAGE eluen kolom P24 rekombinan HIV-1. 1. Elusi pertama, inkubasi 1 jam kolom ligan P24 rekombinan HIV-1 dengan larutan pengelusi, 2. Elusi kedua, inkubasi 2 jam kolom ligan P24 rekombinan HIV-1 dengan larutan pengelusi, 3. Elusi ketiga, inkubasi 18 jam kolom ligan P24 rekombinan HIV-1 dengan larutan pengelusi, 4. Elusi keempat, tanpa diinkubasi, setelah dilakukan elusi ketiga, 5. Marka protein

Setelah eluen diperoleh dengan menampung larutan dapar pengelusi yang telah diinkubasi dalam kolom selama 1 jam (hasil elusi pertama), 2 jam (hasil elusi kedua) dan 18 jam (elusi keempat), dilakukan lagi inkubasi kolom dengan larutan dapar pengelusi selama 1 jam dan 2 jam. Eluen ditampung kembali dan dilakukan elektroforesis SDS- PAGE. Tidak muncul pita pada hasil elektroforesis tersebut (gambar tidak ditampilkan). Hal ini dapat terjadi karena konsentrasi eluen yang rendah atau tidak adanya antibodi yang dapat dielusi. Oleh karena itu western blot penting dilakukan untuk melihat reaktifitas dan keberadaan antibodi di larutan hasil elusi.

Uji western blot dilakukan untuk memastikan pita yang terlihat adalah antibodi spesifik terhadap protein P24 rekombinan HIV-1. Sebelum dilakukan uji

western blot, terlebih dahulu dilakukan elektroforesis protein P24 rekombinan HIV-1 dan *E.coli* BL21. Setelah protein ditransfer ke membran, diberikan serum kelinci dan hasil elusi dengan pengenceran 1/2500 dalam dapar pelarut.

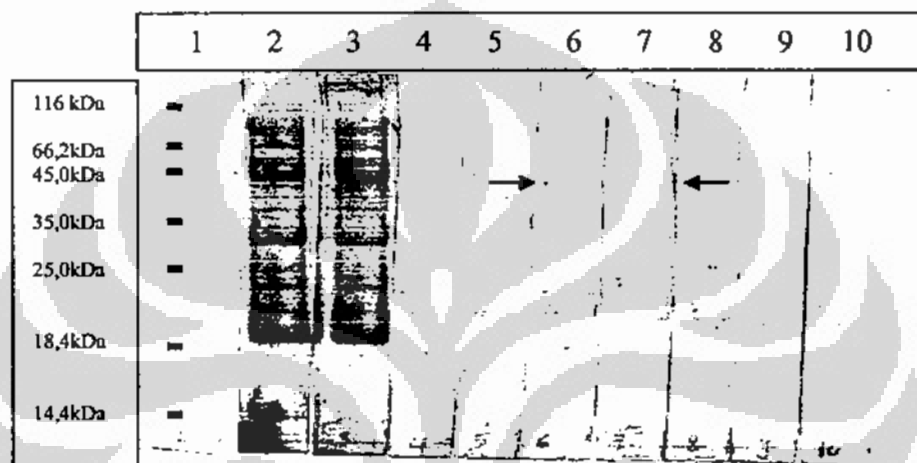


Gambar 4.8. Uji western Blot untuk menguji reaktivitas antibodi kelinci dalam eluen pasca purifikasi kolom P24 rekombinan HIV-1 dengan melapisi kertas nitroselulosa dengan antigen P24 rekombinan dan *E.coli*. Western Blot Antigen P24 HIV-1 rekombinan HIV-1 dengan: lajur 1. Serum kelinci pasca imunisasi, prepurifikasi, lajur 2. Hasil elusi pertama, lajur 3. Hasil elusi kedua, lajur 4. Hasil elusi ketiga, lajur 5. Hasil elusi keempat, lajur 6. Hasil elusi kelima. Lajur 7. Marka protein. Antigen *E.coli* BL21 pada membran nitroselulosa diberi: lajur 8. Hasil elusi pertama, lajur 9. Hasil elusi kedua, lajur 10. Hasil elusi ketiga.

Dari hasil western blot diperoleh bahwa eluen hasil elusi kedua, ketiga dan keempat menunjukkan pita (gambar 4.8, lajur 3,4,5). Hal ini dapat menunjukkan bahwa eluen tersebut reaktif terhadap P24 HIV-1 rekombinan. Pada eluen hasil elusi pertama tidak terdapat pita (gambar 4.8, lajur 2). Hal ini mungkin karena waktu inkubasi belum cukup untuk melepaskan ikatan antigen-antibodi pada kolom, sehingga antibodi belum terelusi. Sedangkan eluen hasil elusi kelima tidak terdapat pita (gambar 4.8, lajur 6) karena diperkirakan antibodi pada kolom telah terelusi seluruhnya pada proses elusi sebelumnya.

Hasil western blot dengan antigen *E.coli* menunjukkan pita non spesifik yang terletak antara berat protein 18,4 kDa dan 25 kDa di kertas nitroselulosa yang diberi

eluen hasil elusi pertama, kedua dan ketiga (gambar 4.8, lajur 8,9,10). Hal ini mungkin saja terjadi karena hasil elusi belum murni benar atau terdapat pengaruh tidak langsung dari gel poliakrilamid atau anti-antibodi kelinci sebagai antibodi kedua. Untuk menguji hal tersebut, dilakukan perbandingan uji western blot antara serum kelinci pre imunisasi, serum kelinci pasca imunisasi-pre purifikasi, serum kelinci hasil elusi dengan antigen *E.coli* BL21 pada membran nitroselulosa.



Gambar 4.9. Uji western blot untuk mengetahui reaktifitas eluen pasca purifikasi dengan antigen *E.coli* BL21 dan pengaruh anti-antibodi kelinci pada antigen *E.coli*. 1. Marka protein. Western Blot *E.coli* BL21 dengan: 2. Serum kelinci pre imunisasi-pre purifikasi, 3. Serum kelinci pasca imunisasi-pre purifikasi, 4. Hasil elusi kedua, 5. Hasil elusi pertama dari kolom *E.coli*, 6. Hasil elusi kedua dari kolom *E.coli*, 7. Hasil elusi ketiga dari kolom *E.coli*, 8. Hasil elusi keempat dari kolom *E.coli*, 9. Hasil elusi keempat dari kolom *E.coli*, 10. Tidak diberikan serum kelinci atau eluen.

Pada uji western blot ini, pita yang muncul pada berat molekul antara 18,4-25 kDa pada uji sebelumnya muncul kembali (gambar 4.9 lajur 2-10). Pita non spesifik tersebut dipastikan bukan karena eluen yang digunakan karena pita tetap ada pada kertas nitroselulosa yang tidak diberi serum atau eluen (gambar 4.9 lajur 10). Timbulnya pita non spesifik ini diduga karena reaksi langsung antara anti-antibodi kelinci dengan protein *E.coli*.

Pada kertas nitroselulosa yang diberi eluen dari kolom *E.coli* hasil elusi kedua dan ketiga terdapat pita antara berat protein 45 kDa dan 116 kDa (gambar 4.9 lajur 6 dan 7). Pita tersebut kemungkinan terbentuk akibat ikatan spesifik antara antibodi terhadap *E.coli* dengan antigennya.

Hasil elusi pada kolom P24 rekombinan HIV-1 menunjukkan tidak terdapat interaksi dengan antigen *E.coli* BL 21. Hal ini dibuktikan dengan tidak terbentuknya pita spesifik dari hasil uji western blot (gambar 4.9 lajur 4).



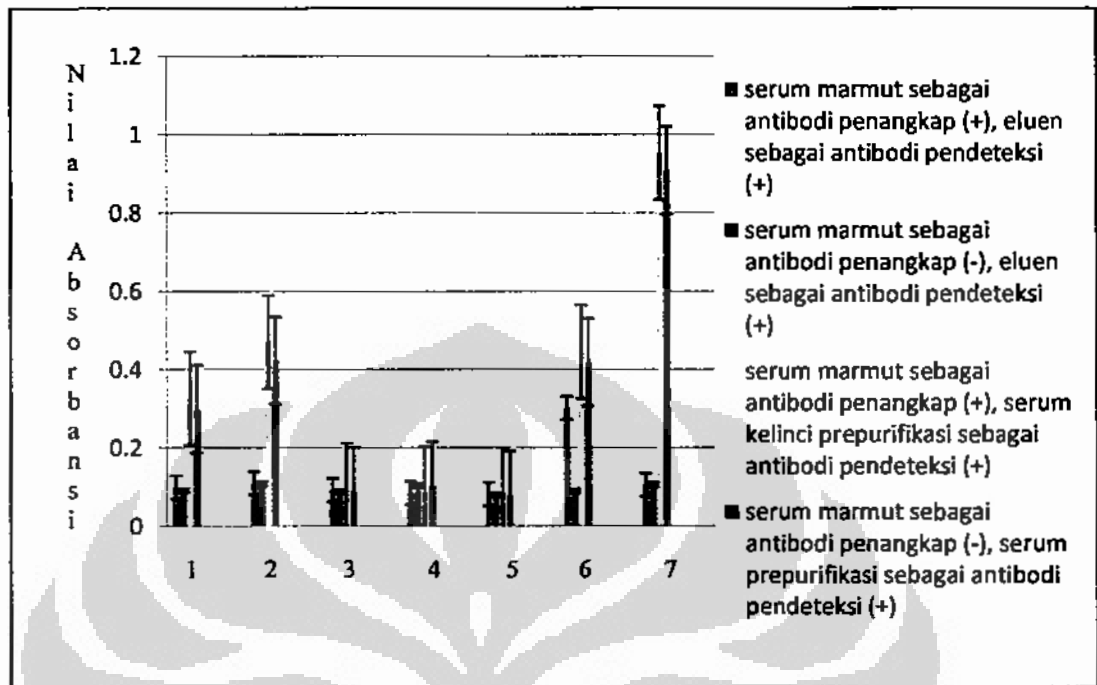
Gambar 4.10. Uji western blot untuk mengetahui pengaruh serum kelinci, eluen, antibodi anti kelinci, substrat dan larutan dapar pemblok terhadap timbulnya ikatan non spesifik. Marka protein. Western Blot tanpa antigen dengan: 2.Serum kelinci pasca imunisasi-pre purifikasi, 3.Serum kelinci eluen kolom P24 rekombinan HIV-1, 4.Serum kelinci eluen kolom *E.coli*. Western Blot antigen P24 rekombinan HIV-1 dengan: 5.Serum kelinci pasca imunisasi-pre purifikasi, 6.Serum kelinci eluen kolom P24 rekombinan HIV-1, 7.Serum kelinci eluen kolom *E.coli*, 8.Tidak diberi serum kelinci tetapi tetap diberikan anti- antibodi kelinci, 9.Serum kelinci pasca imunisasi-pre purifikasi, tetapi tidak diberi anti-antibodi kelinci, 10.Tidak diberikan serum kelinci dan anti-antibodi kelinci

Dari gambar 4.10 terlihat bahwa pada kertas nitroselulosa yang tidak diberi antigen tidak terbentuk pita spesifik yang menunjukkan ikatan antigen-antibodi jika diberi eluen kolom *E.coli* (lajur 4) dan P24 rekombinan HIV-1(lajur 2). Pada kertas nitroselulosa yang diberi antigen P24 rekombinan terbentuk pita jika diberi serum kelinci pasca imunisasi-pre purifikasi dan eluen P24 rekombinan HIV-1, tetapi jika diberi eluen pada kolom *E.coli* pita tersebut tidak terbentuk. Hal ini menunjukkan bahwa hasil elusi pada kolom *E.coli* mengandung antibodi terhadap protein *E.coli*.

Dari gambar 4.10 ini juga terbukti bahwa tidak ada pengaruh anti-antibodi kelinci terhadap terbentuknya pita nonspesifik pada gambar 4.8 dan gambar 4.9. Hal

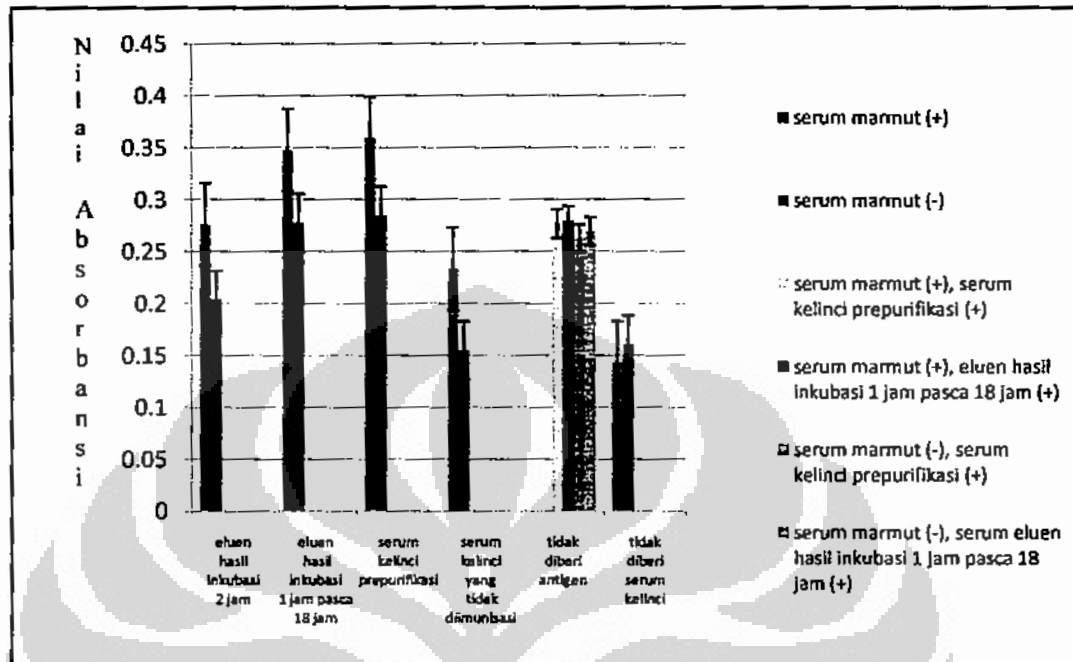
ini dibuktikan dengan tidak terbentuknya pita non spesifik tersebut jika kertas nitroselulosa dilapisi antigen P24 rekombinan HIV-1 yang tidak diberi serum kelinci (gambar 4.10, lajur 8). Ikatan non spesifik tersebut juga tidak terbentuk pada kertas nitroselulosa yang tidak diberi antigen (gambar 4.10, lajur 2-4).

Untuk membuktikan bahwa eluen hasil purifikasi telah cukup murni, dilakukan pengulangan perlakuan seperti pada gambar 4.3 tanpa menggunakan serum manusia HIV positif. Hasil diperoleh bahwa terdapat penurunan nilai absorbansi yang cukup berarti antara eluen hasil purifikasi dengan serum kelinci prepurifikasi (gambar 4.11 poligon 2-biru dibandingkan dengan poligon 2-hijau). Nilai absorbansi eluen juga diatas nilai kontrol negatifnya (gambar 4.11 poligon 1-biru). Inkubasi *E.coli* dengan eluen juga tidak menurunkan nilai absorbansi dalam sistem sandwich ELISA, tetapi nilai tersebut malah menjadi tinggi (gambar 4.11 poligon 6-biru). Tidak terdapatnya penurunan nilai absorbansi akibat inkubasi terjadi karena tidak terdapat ikatan nonspesifik antara *E.coli* dengan komponen dalam eluen. Ini disebabkan karena antibodi terhadap protein *E.coli* dalam serum kelinci telah dihilangkan pada purifikasi dengan ligan *E.coli*. Kemungkinan tersebut juga diperkuat dengan nilai absorbansi eluen yang kurang lebih tetap pada saat dapar pemblok diberi *E.coli* (gambar 4.11 poligon 7-merah dan biru). Peningkatan nilai absorbansi pada poligon 6-biru ini mungkin disebabkan karena masih adanya reaksi antara antibodi-anti kelinci dengan protein *E.coli* yang ditangkap oleh antibodi penangkap. Dari gambar 4.11 juga disimpulkan bahwa komponen larutan dapar pemblok, antigen, antibodi anti-antibodi kelinci tidak menghasilkan nilai absorbansi yang signifikan jika komponen tersebut tidak membentuk sistem sandwich ELISA yang utuh (poligon 3,4,5).



Gambar 4.11. Uji Sandwich ELISA untuk membandingkan nilai absorbansi yang dihasilkan eluen hasil purifikasi menggunakan ligan P24 rekombinan HIV-1 dengan serum kelinci prepurifikasi. Sebagai antibodi pendeteksi digunakan eluen hasil purifikasi kolom P24 rekombinan HIV-1 yang diinkubasi dengan larutan pengelusi selama 18 jam dengan pengenceran 1/50 dan serum kelinci prepurifikasi dengan pengenceran 1/250. 1. Tanpa diberikan antigen p24 rekombinan HIV 1 (kontrol negatif), 2. Diberikan antigen p24 rekombinan HIV 1 (kontrol positif), 3. Tanpa diberikan serum kelinci sebagai antibodi pendeteksi, 4. Tanpa diberikan antigen p24 rekombinan HIV 1 dan serum kelinci sebagai antibodi pendeteksi, 5. Tanpa diberikan antigen p24 rekombinan HIV 1, serum kelinci sebagai antibodi pendeteksi, dan anti IgG kelinci, 6. Serum kelinci diinkubasi dengan *E.coli* (konsentrasi 1/250) selama 1 jam, 7. Larutan dapar pemblok BSA 5% diinkubasi dengan *E.coli* (konsentrasi 5%) selama 1 jam,

Nilai absorbansi eluen hasil purifikasi pada gambar 4.11 (poligon 1-biru) tidak jauh berbeda dengan nilai absorbansi kontrol negatif (poligon 2-biru). Hal ini disebabkan karena pengenceran serum yang tinggi. Oleh karena itu dilakukan uji sandwich ELISA kembali dengan eluen tanpa pengenceran seperti yang tertera pada gambar 4.12.



Gambar 4.12. Uji Sandwich ELISA untuk membandingkan nilai absorbansi yang dihasilkan eluen hasil purifikasi menggunakan ligan P24 rekombinan HIV-1 tanpa pengenceran dengan serum kelinci prepurifikasi.

Pada gambar 4.12 (poligon 4-merah dan biru) terlihat bahwa serum kelinci pre imunisasi menunjukkan nilai absorbansi yang cukup tinggi jika diberi antigen P24 rekombinan HIV-1 pada uji dengan serum marmut dibandingkan dengan tanpa serum marmut. Hal ini menguatkan dugaan bahwa terdapat komponen pada antigen yang dikenali oleh serum kelinci pre imunisasi. Komponen tersebut kemungkinan adalah protein *E.coli* atau komponen virus lain yang dapat menyerupai epitop P24 yang secara alamiah dapat menginfeksi kelinci.

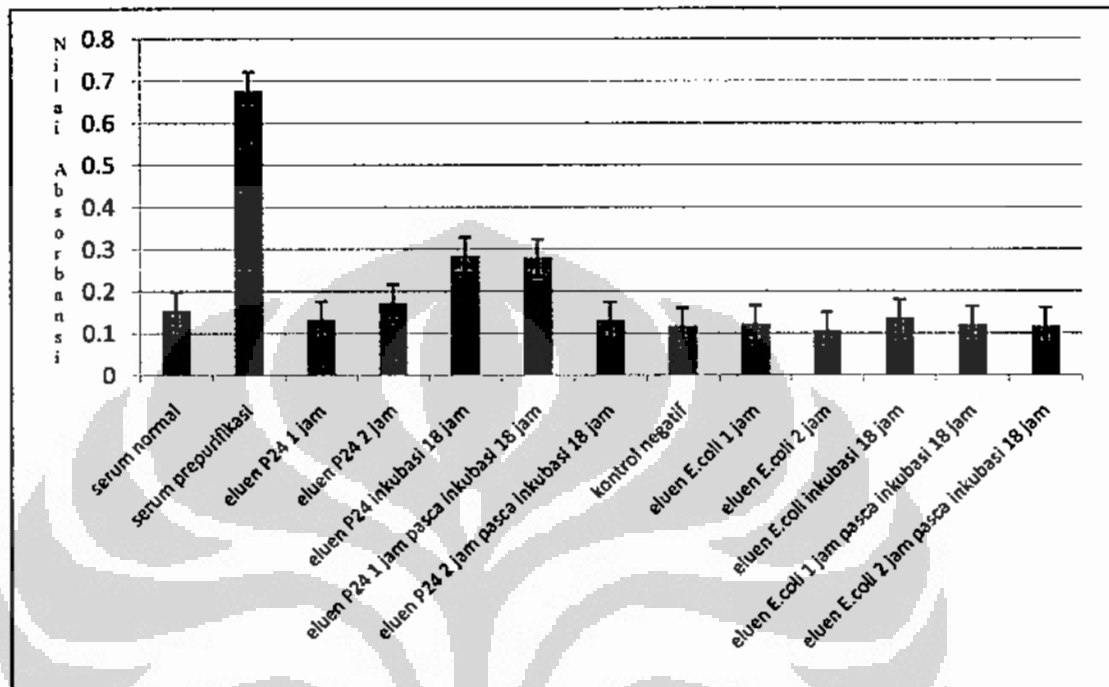
Gambar 4.12 (poligon 1,2,3 merah) juga memperlihatkan uji tanpa serum marmut yang menggunakan serum kelinci pasca imunisasi sebagai antibodi pendeteksi memiliki nilai absorbansi yang berbeda secara signifikan dengan nilai absorbansi pada uji yang menggunakan serum kelinci pre imunisasi (poligon 4 merah). Hal ini juga didukung data pada uji tanpa antigen, nilai absorbansinya tinggi. Data ini menunjukkan bahwa serum pasca imunisasi memiliki ikatan non spesifik dengan komponen dalam dapar pelarut, diduga dengan BSA dan ikatan ini tidak hilang setelah purifikasi. Kemungkinan ini muncul akibat pengaruh preparasi pada saat imunisasi pada peningkatan nilai absorbansi tersebut.

4.5. Penentuan konsentrasi antibodi pendeteksi pasca purifikasi pada sistem sandwich ELISA pendeteksi protein P24 rekombinan HIV-1

Setelah hasil purifikasi sudah cukup murni, eluen hasil purifikasi kolom P24 rekombinan HIV-1 dan *E.coli* diuji dengan teknik sandwich ELISA. Sinyal yang dihasilkan dibandingkan dengan serum kelinci normal, pre purifikasi, dan kontrol negatif. Eluen hasil purifikasi kolom P24 rekombinan HIV-1 menunjukkan adanya penurunan sinyal dibandingkan dengan serum prepurifikasi (gambar 4.13, poligon 3-7). Hal ini terjadi karena ikatan non spesifik yang terbentuk pada sistem dengan serum kelinci yang belum dimurnikan telah berkurang karena adanya purifikasi antibodi dalam serum. Nilai absorbansi eluen tersebut telah melewati nilai absorbansi kontrol negatif (gambar 4.13, poligon 8) sehingga dapat diperkirakan bahwa nilai absorbansi yang timbul berasal dari ikatan antigen-antibodi yang spesifik, bukan karena pengaruh komponen lain dalam sistem. Jika nilai absorbansi eluen dibandingkan dengan nilainya jika digunakan serum normal, terdapat eluen yang nilai absorbansinya masih di bawah nilai serum normal (gambar 4.13, poligon 3 dan 7). Oleh karena itu diperlukan optimasi untuk mencari konsentrasi eluen yang optimal untuk dapat digunakan dalam sistem ini.

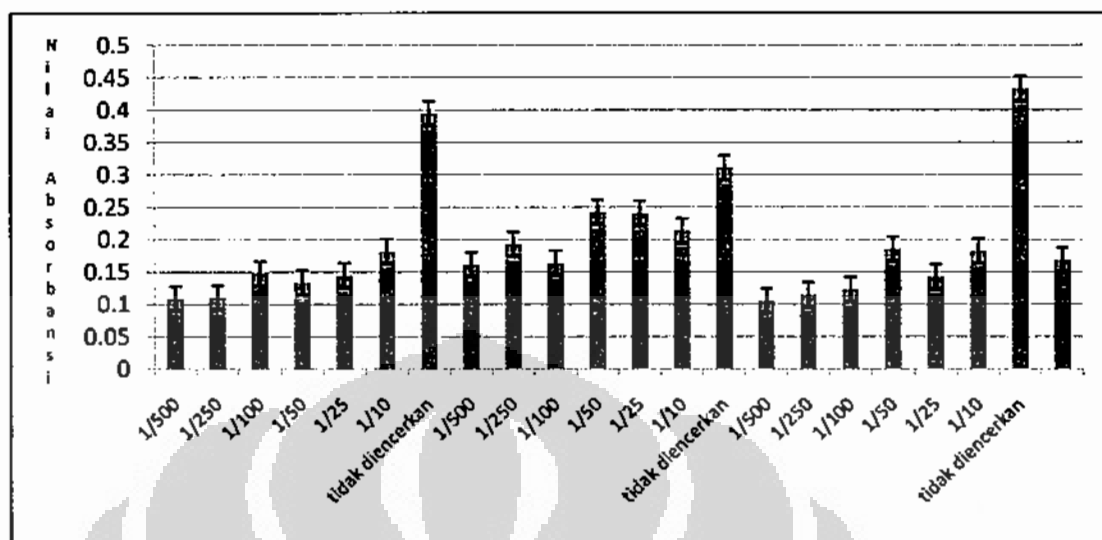
Pada eluen hasil purifikasi kolom *E.coli* diperoleh nilai absorbansi yang rendah karena diperkirakan tidak terdapat ikatan antigen P24 HIV-1 dan antibodi

terhadap *E.coli* pada sistem sandwich ELISA tersebut. Hal ini juga membuktikan bahwa jumlah antibodi P24 rekombinan HIV-1 pada kolom tersebut minimal.



Gambar 4.13. Sistem sandwich ELISA untuk membandingkan sinyal yang dihasilkan serum kelinci pre purifikasi dengan serum kelinci hasil purifikasi kolom P24 rekombinan HIV-1 dan kolom *E.coli*. Serum diencerkan sampai dengan konsentrasi 1/50.

Hasil optimasi konsentrasi menunjukkan bahwa pengenceran optimal yang menghasilkan nilai absorbansi tertinggi berbeda-beda pada setiap eluen hasil kolom P24 rekombinan HIV-1. Pada eluen kedua (hasil inkubasi 2 jam), ketiga (hasil inkubasi 18 jam) dan keempat (1 jam pasca 18 jam) diperoleh absorbansi optimal pada konsentrasi tanpa pengenceran (gambar 4.14, poligon 7, 14 dan 21).



Gambar 4.14. Hasil optimasi konsentrasi serum kelinci hasil purifikasi kolom P24 rekombinan HIV-1 dengan sistem sandwich ELISA. Poligon 1-7: serum kelinci yang digunakan eluen hasil elusi kedua, poligon 8-14: serum kelinci yang digunakan eluen hasil elusi ketiga, poligon 15-21: serum kelinci yang digunakan eluen hasil elusi keempat, poligon 22: kontrol negatif.

Pemeriksaan dengan sensitivitas tinggi diperlukan karena salah satu tujuan pengembangan sistem sandwich ELISA pendeteksi P24 HIV-1 untuk penapisan awal infeksi HIV-1. Penggunaan antibodi poliklonal pada sistem ELISA tidak langsung mempunyai beberapa keuntungan dalam hal sensitivitas. Jika digunakan antibodi monoklonal pada sistem ELISA hanya satu epitop tertentu saja yang mampu dikenali sistem, epitop lain yang terdapat pada protein P24 tidak dapat terdeteksi, sehingga dapat menyebabkan hasil negatif palsu. Pohanka M, et al (2008) membandingkan sistem ELISA tidak langsung pendeteksi antigen *F.tularensis* yang menggunakan antibodi poliklonal dengan antibodi monoklonal. Disimpulkan bahwa dengan menggunakan antibodi poliklonal sistem tersebut mampu mendeteksi antigen dengan pengenceran yang lebih tinggi dibandingkan menggunakan antibodi monoklonal. Selain itu, ambang batas pendeteksi (*limit of detection*) sistem dengan antibodi poliklonal lebih rendah.²⁸ Namun demikian, pemeriksaan dengan sistem sandwich ELISA ini harus dikonfirmasi dengan pemeriksaan lain sesuai dengan alur pemeriksaan yang telah ditetapkan WHO.¹⁷

Purifikasi serum kelinci pada penelitian ini menggunakan teknik kromatografi afinitas, bertujuan menghilangkan pengaruh antibodi terhadap protein

E.coli yang terbentuk akibat proses ekspresi protein rekombinan P24.¹¹ Penelitian Bergmann-Leitner ES menyimpulkan teknik kromatografi afinitas dan presipitasi merupakan metode terbaik untuk memurnikan antibodi dalam serum yang berasal dari kelinci.²⁰

Metode kromatografi afinitas yang dipilih pada penelitian ini menggunakan *CnBr Sepharose Activated For Fast Flow (Pharmacia)* karena makromolekul yang memiliki gugus amino umumnya mudah diimobilisasi pada agarose melalui metode aktivasi CnBr.²¹ Cyanogen bromida mempunyai kapasitas yang tinggi dalam pelekatan ligan.²³ Kromatografi afinitas ini memiliki keunggulan karena bersifat eluen yang diperoleh bersifat spesifik terhadap ligan P24 rekombinan HIV-1, sedangkan kerugiannya adalah proses elusi yang dapat mengubah konformasi protein hasil elusi.

Pada penelitian ini digunakan larutan dapar pengelusi dengan pH 2,7, di bawah titik isoelektrik antibodi, sehingga dapat memutus ikatan non-kovalen antara antigen dan antibodi. Dampak negatif penggunaan pH yang ekstrim pada antibodi adalah mengubah bentuk antibodi tersebut menjadi 'bentuk T'.³¹ Perubahan konformasi antibodi ini dikhawatirkan dapat menurunkan sinyal absorbansi yang dihasilkan sistem sandwich ELISA. Untuk mengurangi hal ini, dilakukan penambahan Tris HCL pH 8 pada saat menampung hasil elusi dengan tujuan menetralkan pH yang asam.^{20,32}

Pemilihan ligan *E.coli* untuk dilekatkan dalam kolom purifikasi berdasarkan hasil optimasi yang mengindikasikan terbentuknya ikatan non spesifik antara serum kelinci dan antigen *E.coli*. Hal ini dapat terjadi karena proses produksi antibodi dan antigen rekombinan tersebut.^{11,28} Pada penelitian Apriliana E, et al, pada proses produksi telah dilakukan ekspresi gen P24 rekombinan HIV-1 dalam bakteri *E.coli* BL21. Protein yang berasal dari *E.coli* ini menjadi protein non spesifik pada larutan protein rekombinan yang diinjeksikan ke hewan coba. Hewan coba dapat membentuk antibodi terhadap protein tersebut.¹¹

Dari hasil optimasi untuk mengidentifikasi ikatan non-spesifik pada sistem sandwich ELISA, diperoleh informasi bahwa BSA yang merupakan komponen utama

larutan dapar pelarut dan pemblok mempengaruhi nilai absorbansi sistem. Pengaruh ikatan nonspesifik terhadap BSA ini belum sepenuhnya dapat dihilangkan dengan proses pencucian pada kolom purifikasi.

Melalui uji sandwich ELISA dan Western Blot, serum kelinci yang diperoleh sebelum diimunisasi antigen P24 rekombinan HIV-1 memperlihatkan adanya antibodi terhadap E.coli. Hal ini dapat terjadi karena infeksi bakteri secara alamiah. Dugaan ini diperkuat dengan penelitian Apriliana yang menyebutkan bahwa terdapat infeksi pada kelinci yang digunakan.¹¹

Dari penelitian juga diperoleh informasi bahwa antibodi berlabel biotin untuk mengenali antibodi kelinci mempunyai reaktifitas terhadap protein E.coli. Hal tersebut dapat terjadi karena tidak maksimalnya proses pemurnian antibodi tersebut saat diproduksi. Penghilangan ikatan non-spesifik ini dapat dilakukan dengan peningkatan konsentrasi detergen non ionik pada larutan dapar pencuci dan dapar pelarut. Deterjen dapat menghilangkan interaksi nonspesifik antar protein.³³

Penggunaan eluen dalam sistem sandwich ELISA menunjukkan hasil optimal jika tanpa diencerkan. Hal ini terjadi karena rendahnya konsentrasi antibodi spesifik dalam eluen. Rendahnya konsentrasi ini dapat disebabkan oleh rendahnya jumlah antibodi spesifik yang terbentuk dalam serum kelinci atau akibat pencucian pada saat proses purifikasi. Oleh karena itu, dianjurkan untuk meningkatkan jumlah booster saat imunisasi dan melakukan purifikasi antibodi dengan jumlah serum yang besar sehingga diperoleh eluen dengan konsentrasi antibodi spesifik yang lebih tinggi.³²

BAB 5

KESIMPULAN DAN SARAN

5.1. Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan :

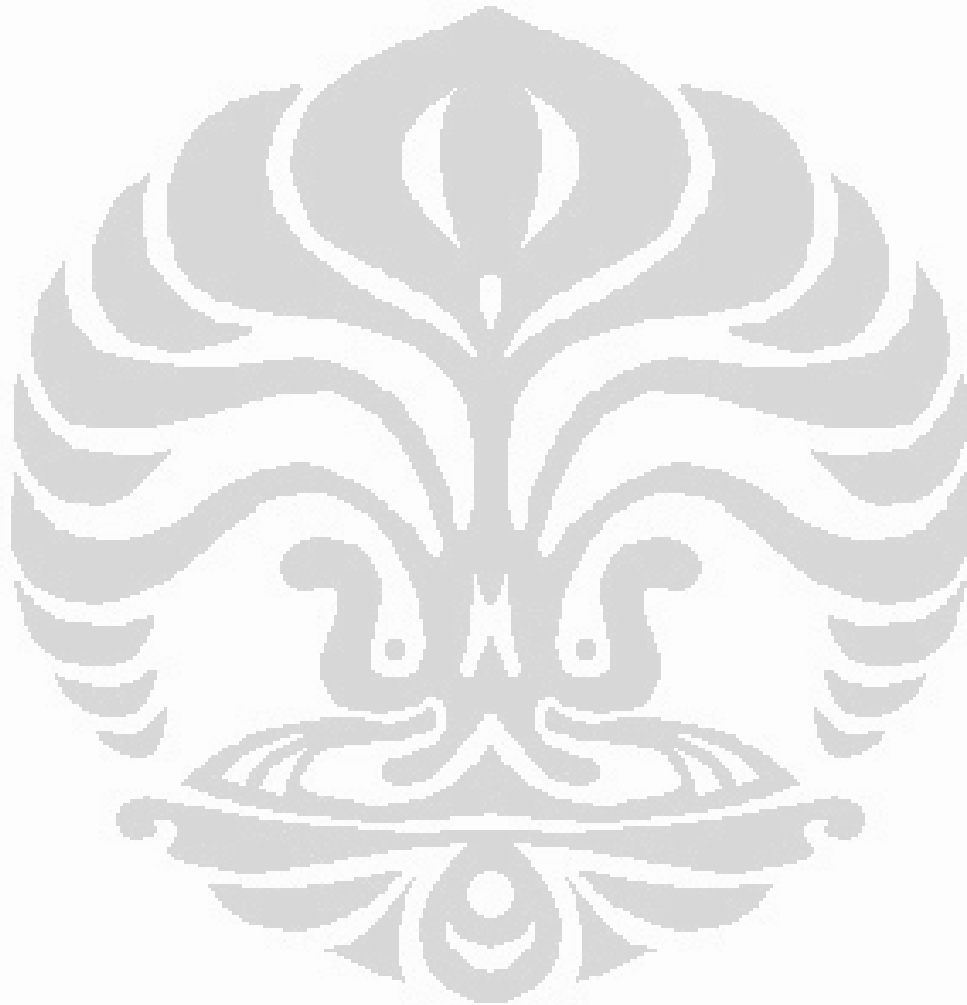
- 1.1. Antibodi poliklonal yang terdapat dalam serum marmut dan kelinci pasca imunisasi dengan antigen P24 rekombinan HIV-1 menunjukkan reaktifitas dengan antigennya melalui uji sandwich ELISA dan Western Blot.
- 1.2. Serum kelinci sebagai antibodi pendeteksi merupakan komponen utama timbulnya ikatan non spesifik dalam sistem sandwich ELISA yang dikembangkan. Reaksi non spesifik terbentuk akibat reaktifitas serum kelinci dengan protein *E.coli* BL21 dan BSA.
- 1.3. Purifikasi antibodi dengan menggunakan *Cn-Br Sepharose Activated For Fast Flow* (Pharmacia) sebagai matriks telah berhasil dilakukan dengan kondisi optimal pemurnian dan telah diperoleh eluen yang mengandung antibodi terhadap P24 rekombinan HIV-1 yang tidak bereaksi dengan protein *E.coli*.
- 1.4. Untuk mendeteksi antigen rekombinan P24 HIV-1 dengan sistem sandwich ELISA yang dikembangkan, diperlukan serum kelinci hasil purifikasi dari kolom P24 rekombinan tanpa pengenceran.
- 1.5. Reagensia yang digunakan dalam sistem pendeteksi berpotensi menimbulkan ikatan non spesifik yang dapat mengganggu nilai absorbansi, sehingga sebelum digunakan harus dinilai kelayakannya untuk digunakan dalam sistem diagnostik tertentu.

5.2. Saran

Beberapa saran yang dapat digunakan untuk penelitian lanjutan antara lain:

- 1.1. Perlu dilakukan purifikasi lanjutan pada serum kelinci untuk menghilangkan ikatan non spesifik terhadap BSA sebagai komponen dapar pemblok.

- 1.2. Perlu dilakukan optimasi metode sandwich ELISA dengan serum kelinci hasil purifikasi antibodi sebagai antibodi pendeteksi untuk mendeteksi antigen P24 dalam serum manusia.
- 1.3. Perlu dilakukan uji sensitivitas dan spesifisitas sistem sandwich ELISA yang dikembangkan



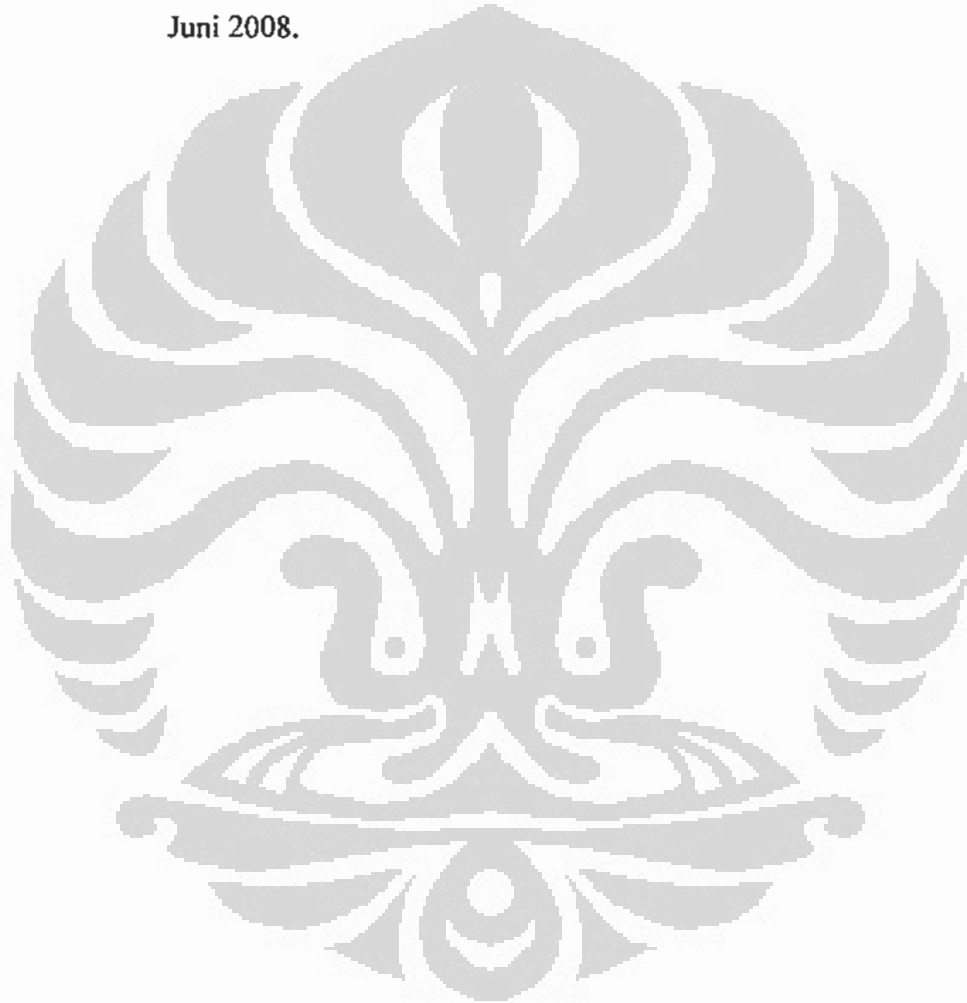
DAFTAR REFERENSI

1. Bratawidjaja KG. *Imunologi Dasar*. Edisi ketujuh. Jakarta: Balai Penerbit Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia; 2009: 349-57.
2. Kindt TJ, Goldsby RA, and Osborne BA. *Kubby Immunology*. 6th ed. New York: WH Freeman and Company; 2007: 493-523.
3. Burke DS, McCutchan FE. *Global distribution of human immunodeficiency virus-1 clade*. In: De Vita VT, Hellman S, Rosenberg SA, editors. *AIDS: etiology, diagnosis, treatment and prevention*. 4th ed. Philadelphia: Lippincott-Raven; 1997: 119-25.
4. *Joint United Nations Programme on HIV/AIDS. Overview of The Global AIDS Epidemic, 2006. Report on The Global AIDS Epidemic*. 2006.
5. Klausner JD. *Diagnostic Assay for HIV-1 Infection*. *MLO July* 2004; 12-20.
6. Bhardwaj D, Bhatt S, Khamar BM, Modi, Ghosh PK. *Recombinant HIV1 p24 protein: cloning, expression, purification and use in the development of ELISA kit*. *Current Science October* 2006; 91(7): 913-17.
7. Kandathil AJ, Ramalingam S, Kannangai R, David S, Sridharan G. *Molecular epidemiology of HIV*. *Indian J Med Res April* 2005; 21: 333-44.
8. Listyaningsih E, et al. *Genetic and demographic characterization of Indonesian HIV cases from 1993 to 2000*. Disampaikan pada 6th Asia Pacific Congress of Medical Virology, Kuala Lumpur, 7-10 Desember, 2003.
9. Saville RD, et al. *Fourth-Generation Enzyme Linked Immunosorbent Assay for the simultaneous detection of human immunodeficiency virus antigen and antibody*. *Journal of Clinical Microbiology July* 2001; 39(7): 2518-24.

10. *National HIV testing policy*. Diunduh dari <http://www.nacoononline.org/publication/7.pdf>. Diakses pada tanggal 10 April 2007.
11. Apriliana E. Produksi antibodi pokliklonal yang spesifik terhadap antigen P24 Human Immunodeficiency I (HIV-1) untuk pengembangan sistem diagnostik infeksi HIV-1. Tesis. Program Pasca Sarjana, Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia. Jakarta 2008.
12. Diunduh dari <http://www.medguide.org.zm/aids/aids.htm>. Diakses pada tanggal 6 April 2007.
13. Voyles BA. *Biology of the viruses*. 2nd ed. New York: Mc Graw Hill; 2002.
14. Metcalf JA, Dvey Jr RT, Lane HC. *Acquired immunodeficiency syndrome: Serologic and virologic test*. In: De Vita VT, Hellman S, Rosenberg SA, editors. *AIDS: etiology, diagnosis, treatment and prevention*. 4th ed. Philadelphia: Lippincott-Raven; 1997: 177-93.
15. Popov RC, Constantine NT, and Weber J. *Humoral immune respons and detection during HIV infection*. In: Karn J, editor. *HIV A Practical Approach vol.1 Virology and Immunology*. Oxford: IRL Press; 1998:191-209.
16. Sickinger E, et al. *Multicenter evaluation of a new, automated enzyme-linked immunoassay for detection of human immunodeficiency virus-specific antibodies and antigen*. *Journal of Clinical Microbiology* January 2004; 42(1):21-9.
17. CDC/WHO/APHL. *Guidelines for appropriate evaluations of HIV testing technology in Africa*; 2001. Diunduh dari <http://www.who.int> . Diakses pada tanggal 17 April 2007.
18. Kresno SB, *Diagnosis dan Prosedur Laboratorium*. Edisi keempat. Jakarta: Balai Penerbit Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia; 2001.
19. Abbas AK, Lichtman AH. *Cellular and molecular immunology*. Updated ed. Pennsylvania: Elsevier Saunders; 2005.

20. Bergmann Leitner SE, et al. *Evaluation of immunoglobulin purification methods and their impact on quality and yield of antigen-specific antibodies. Malaria Journal July 2008, 7:129.*
21. Johnstone A, Thorpe R. *Affinity chromatography and immunoprecipitation. In: Immunochemistry In Practice. 2nd ed. Blackwell Scientific Publications. London. 1987:207-23.*
22. Delves PJ. *Purification of antigen or antibody. In: Antibody Application, Essential Techniques. John Wiley&Sons. 1995:85-9.*
23. Harlow E and Lane D. *Antibodies- A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory. 1988: 511-18, 532.*
24. GE Healthcare. *Instructions 71-7086-00 AD. CNBr-activated sepharose 4B. Diunduh dari: www.gehealthcare.com. Diakses pada tanggal*
25. GE Healthcare. *Antibody Purification Handbook. Diunduh dari: www.gehealthcare.com. Diakses pada tanggal 12 Juni 2008.*
26. Benjamin E, Leskowitz S. *Immunology: A Short Course. 2nd ed. New York: Wiley Liss; 1991: 101-122.*
27. Saville RD, et al. *Fourth-Generation Enzyme Linked Immunosorbent Assay for the simultaneous detection of human immunodeficiency virus antigen and antibody. Journal of Clinical Microbiology July 2001; 39(7): 2518-24.*
28. Pohanka M, et al. *ELISA detection of Francisella tularensia using polyclonal and monoclonal antibodies. Defence Science Journal 2008; 58(5): 698-702.*
29. Przybycien TM. *Protein-protein interactions as a means of purification. Current Opinion in Biotechnology 1998; 9:164-70.*
30. Youssofian H. *Immunoaffinity purification of antibodies against GST fusion protein. BioTechniques Journal February 1998; 24:198-202.*

31. Bagchi P dan Birnbaum SM. *Effect of pH on the adsorption of immunoglobulin G on anionic poly(vinyltoluene) model latex particles. Journal of Colloid and Interface Science October 1981; 83(2):460-78.*
32. GE Healthcare. *Afinity Purification Handbook*. Diunduh dari: www.gehealthcare.com. Diakses pada tanggal 12 Juni 2008.
33. KPL. ELISA. Diunduh dari: www.kpl.com. Diakses pada tanggal 12 Juni 2008.



DAFTAR RIWAYAT HIDUP

Nama : Deka Larasati

Tempat/Tanggal Lahir: Bogor, 17 Agustus 1978

Alamat : Komp. Pamulang Permai I Blok A8/9, Ciputat, Tangerang

Riwayat Pendidikan : 1984-1990 SDN Merdeka 5/IV Bandung

1990-1993 SMPN 5 Bandung

1993-1996 SMAN 1 Bogor

1996-2000 Sarjana Kedokteran- FKUI Jakarta

2000-2002 Profesi Dokter Umum- FKUI Jakarta

2006-sekarang Strata II-Biomedik FKUI Jakarta

Riwayat Pekerjaan : 2002-sekarang Dokter Umum di Jakarta Medical Center Group

2005-sekarang Asisten Ahli di Universitas Negeri Jakarta

Biaya Penelitian : Diperoleh dari RUT XI dan RUUI 2008

LAMPIRAN

Lampiran 1. Data nilai absorbansi pada menit kedua puluh pada gambar 4.2 (Uji reaktivitas serum kelinci dan marmut dengan antigen P24 rekombinan HIV-1 dengan teknik ELISA).

	Diberi serum kelinci	Diberi serum marmut	Tanpa antibodi pendeteksi, diberi antibodi anti kelinci	Tanpa antibodi pendeteksi, diberi antibodi anti marmut
Coating dengan ag Konsentrasi Ag 50 ng/mL Ag-	0.545	0.201	0.166666667	0.1855
Coating dengan Ag Konsentrasi 100 ng/ml	0.180333333	0.136	0.126666667	0.143
Coating dengan E.coli	0.834666667	0.275333333	0.191666667	0.150333333
	0.639	0.159	0.149666667	0.158333333

Lampiran 2. Data nilai absorbansi pada menit kedua puluh pada gambar 4.3 (Uji Sandwich ELISA untuk mencari ikatan non spesifik yang mempengaruhi absorbansinya).

	rp24 negatif	rp24 positif	rp24 positif, serum kelinci negative	rp24 negatif, serum kelinci negatif	Rp24 negatif, serum kelinci negatif, anti ab kelinci negatif
SERUM MARMUT POSITIF	0.264	0.441	0.123	0.147	0.124
SERUM MARMUT NEGATIF	0.23	0.442	0.107	0.115	0.108
	rp24 positif, serum kelinci diinkubasi E.coli	rp24 positif, larutan blocking diinkubasi E.coli	rp24 digantikan serum HIV+	serum HIV+ negatif, serum kelinci negatif	serum HIV+ negatif, serum kelinci negatif, anti ab kelinci negatif
SERUM MARMUT POSITIF	0.35	0.96	0.384	0.115	0.1
SERUM MARMUT NEGATIF	0.276	0.739	0.232	0.146	0.093

(Lanjutan)

	ip24 digantikan serum HIV-	serum HIV- negatif	serum HIV- negatif, serum kelinci negative	serum HIV- negatif, serum kelinci anti ab kelinci negatif	larutan bloking negatif	tidak ada perlakuan
SERUM MARMUT POSITIF	0.307	0.311	0.1045	0.104	0.433	0.122
SERUM MARMUT NEGATIF	0.213	0.254	0.115	0.109	0.043	0.03

Lampiran 3. Data rerata nilai absorbansi menit kedua puluh pada gambar 4.4 (Uji Sandwich ELISA untuk mengetahui perbedaan waktu inkubasi serum kelinci dengan larutan dapar pelarut yang mengandung BSA dengan berbagai konsentrasi).

	SERUM KELINCI TIDAK DIINKUBASI DENGAN LARUTAN DAPAR PELARUT	SERUM KELINCI DIINKUBASI 1 JAM DENGAN LARUTAN DAPAR PELARUT	SERUM KELINCI DIINKUBASI 2 JAM DENGAN LARUTAN DAPAR PELARUT	SERUM KELINCI DIINKUBASI 3 JAM DENGAN LARUTAN DAPAR PELARUT
LARUTAN DAPAR PELARUT DENGAN BSA 5%	0.675	0.736333333	0.587	0.567333333
LARUTAN DAPAR PELARUT DENGAN BSA 2,5%	0.832666667	0.535666667	0.751	0.83
LARUTAN DAPAR PELARUT DENGAN BSA 0,25%	1.165333333	0.964666667	1.026333333	1.044666667

Lampiran 4. Data rerata nilai absorbansi menit kedua puluh pada gambar 4.5 (Uji sandwich ELISA untuk mengetahui pengaruh konsentrasi protein E.coli BL21 dalam pelarut serum kelinci terhadap terbentuknya sinyal yang ditimbulkan dalam sistem tersebut untuk mendeteksi antigen P24 rekombinan HIV-1).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Serum kelinci diinkubasi dengan E. Coli	0.579	0.475	0.496	0.508	0.527	0.582	0.646	0.642	0.642	0.692	0.645

Lampiran 5. Data rerata nilai absorbansi menit kedua puluh pada gambar 4.11 (Uji Sandwich ELISA untuk membandingkan nilai absorbansi yang dihasilkan eluen hasil purifikasi menggunakan ligan P24 rekombinan HIV-1 dengan serum kelinci prepurifikasi)

	rp24 negatif	rp24 positif	rp24 positif, serum kelinci negatif	rp24 negatif, serum kelinci negatif	Rp24 negatif, serum kelinci negatif, anti ab kelinci negatif	rp24 positif, serum kelinci diinkubasi E.coli	rp24 positif, larutan blocking diinkubasi E.coli
ELUEN	SERUM MARMUT POSITIF	0.1105	0.093	0.085	0.082	0.3025	0.106
	SERUM MARMUT NEGATIF	0.092	0.09	0.1045	0.08	0.091	0.1065
SERUM PREPURIFIKASI	SERUM MARMUT POSITIF	0.327	0.4705	0.085	0.082	0.446	0.9535
	SERUM MARMUT NEGATIF	0.3	0.424	0.1045	0.08	0.4195	0.909

Lampiran 6. Data rerata nilai absorbansi menit kedua puluh pada gambar 4.12 (Uji Sandwich ELISA untuk membandingkan nilai absorbansi yang dihasilkan eluen hasil purifikasi menggunakan ligan P24 rekombinan HIV-1 tanpa diencerkan dengan serum kelinci prepurifikasi).

	eluen hasil inkubasi 2 jam	eluen hasil inkubasi 18 jam	serum kelinci prepurifikasi	serum kelinci yang tidak diimmnisasi	tidak diberi antigen	tidak diberi serum kelinci
dengan antibodi marmut	0.2765	0.348	0.3595	0.2335		0.1435
tanpa antibodi marmut	0.204	0.278	0.285	0.155		0.161
serum prepurikasi eluen					0.277	
serum prepurikasi eluen					0.28	
					0.263	
					0.27	

Lampiran 7. Data rerata nilai absorbansi menit kesepuluh pada gambar 4.13 (Sistem sandwich ELISA untuk membandingkan sinyal yang dihasilkan serum kelinci pre purifikasi dengan serum kelinci hasil purifikasi kolom P24 rekombinan HIV-1 dan kolom E.coli. Serum diencerkan sampai dengan konsentrasi 1/50).

serum normal	0.1555	0.679	0.1335	0.174	0.2855	0.28	0.132	0.1185	0.1235	0.1075	0.1375	0.121	0.1175
		eluen P24 inkubasi 1 jam	eluen P24 inkubasi 2 jam	eluen P24 inkubasi 18 jam	eluen P24 inkubasi 1 jam pasca inkubasi 18 jam	eluen P24 inkubasi 2 jam pasca inkubasi 18 jam	eluen P24 inkubasi 2 jam pasca inkubasi 18 jam	kontrol negatif	eluen E.coli inkubasi 1 jam	eluen E.coli inkubasi 2 jam	eluen E.coli inkubasi 18 jam	eluen E.coli inkubasi 1 jam pasca inkubasi 18 jam	eluen E.coli inkubasi 2 jam pasca inkubasi 18 jam

Lampiran 8. Data rerata nilai absorbansi menit kedua puluh pada gambar 4.14 (Hasil optimasi konsentrasi serum kelinci hasil purifikasi kolom P24 rekombinan HIV-1 dengan sistem sandwich ELISA).

ELUEN KOLOM P24 REKOMBINAN HIV-1 INKUBASI 2 JAM					
1/500	1/250	1/100	1/50	1/25	1/10 tidak diencerkan
0.1095	0.111	0.148	0.134	0.1455	0.1825 0.3955

ELUEN KOLOM P24 REKOMBINAN HIV-1 INKUBASI 18 JAM					
1/500	1/250	1/100	1/50	1/25	1/10 tidak diencerkan
0.162	0.1935	0.1645	0.243	0.241	0.214 0.3115

ELUEN KOLOM P24 REKOMBINAN HIV-1 INKUBASI 1 JAM SETELAH 18 JAM					
1/500	1/250	1/100	1/50	1/25	1/10 tidak diencerkan
0.106	0.1155	0.1235	0.186	0.143	0.183 0.4335
KONTROL NEGATIF					0.169

Lampiran 9. Rangkuman Penjelasan Gambar Hasil Uji ELISA

GAMBAR 4.2	Poligon 1 dan 2 merah dan biru	Terdapat perbedaan nilai absorbansi serum uji dengan kontrol negative	Serum kelinci dan marmut reaktif terhadap antigen P24 rekombinan HIV-1
	Poligon 1 dan 2 ungu dibandingkan dengan 1 dan 2 biru		Serum kelinci dan marmut reaktif terhadap antigen E.coli
GAMBAR 4.3	Poligon 2 merah dibandingkan dengan 2 biru	Nilai absorbansi tanpa serum marmut tidak berbeda dengan sistem dengan serum marmut	Serum marmut sebagai antibodi penangkap kurang mempengaruhi kerja sistem sandwich ELISA
	Poligon 1-5 merah dibandingkan dengan 1-5 biru		
	Poligon 3,4,5 dibandingkan dengan poligon 2	Penurunan nilai absorbansi secara bermakna	Penghilangan komponen serum kelinci mempengaruhi sistem
	Poligon 6 biru dibandingkan poligon 2 biru	Penurunan nilai absorbansi secara bermakna	Pada serum kelinci terdapat antibodi terhadap E.coli
	Poligon 7 merah dan biru		
GAMBAR 4.4	Poligon 6 merah dibandingkan poligon 2 merah	Penurunan nilai absorbansi secara bermakna	Serum kelinci bereaksi dengan BSA atau komponen lain pada larutan dapat pemblok
		Semakin tinggi konsentrasi BSA semakin rendah nilai absorbansi yang dihasilkan	Ada pengaruh langsung antara BSA dengan serum kelinci
GAMBAR 4.5		Semakin encer protein E.coli, semakin tinggi nilai absorbansi	Waktu inkubasi tidak mempengaruhi nilai absorbansi
			Hal ini disebabkan karena reaksi netralisasi antigen E. coli dengan antibodinya pada serum
GAMBAR 4.11	Poligon 2 biru dibandingkan dengan poligon 2 hijau	Penurunan nilai absorbansi secara bermakna	Elven hasil purifikasi telah cukup murni
	Poligon 2 biru dibandingkan dengan poligon 1 biru	Penurunan nilai absorbansi secara bermakna	

(Lanjutan)

	Poligon 6 biru dibandingkan poligon 2 biru	Nilai absorbansi meningkat	Tidak terdapat ikatan non spesifik antara <i>E. coli</i> dengan eluen. Nilai absorbansi yang meningkat disebabkan karena kekentalan serum yang diinkubasi <i>E. coli</i> yang meningkat
	Poligon 7 merah dan biru	Tidak terdapat peningkatan nilai absorbansi	Eluen hasil purifikasi tidak bereaksi dengan protein <i>E. coli</i>
	Poligon 1 biru dibandingkan dengan poligon 2 biru	Nilai absorbansi eluen tidak berbeda dengan kontrol negatif	Pengenceran terlalu tinggi
	Poligon 4 merah dan biru	Nilai absorbansi serum pre imunisasi lebih tinggi jika dengan serum marmut dibandingkan tanpa serum marmut	Komponen pada antigen yang dikenali oleh serum kelinci pre imunisasi. Komponen tersebut kemungkinan adalah protein <i>E. coli</i> atau komponen virus lain yang dapat menyerupai epitop P24 yang secara alamiah dapat menginfeksi kelinci
GAMBAR 4.12	Poligon 1,2,3 merah dibandingkan poligon 4 merah	Nilai absorbansi lebih bervariasi dan lebih tinggi dibandingkan nilai absorbansi serum preimunisasi	Serum pasca imunisasi memiliki ikatan non spesifik dengan komponen dalam dapa pelarut, diduga dengan BSA dan ikatan ini tidak hilang setelah purifikasi. Kemungkinan ada pengaruh preparasi pada saat imunisasi pada peningkatan nilai absorbansi tersebut
GAMBAR 4.13	Poligon 3-7 dibandingkan dengan poligon 2, dan poligon 8	Nilai absorbansi lebih rendah	Ikatan non spesifik diduga telah berkurang
GAMBAR 4.14	Poligon 7,14,21		Nilai absorbansi optimal pada eluen tanpa pengenceran

Artikel untuk Majalah Kedokteran Indonesia

**PURIFIKASI ANTIBODI POLIKLONAL SEBAGAI REAGENSIA
SANDWICH ELISA PENDETEKSI PROTEIN P24 HUMAN
IMMUNODEFICIENCY VIRUS-1 (HIV-1)**

Deka Larasati*, Budiman Bela**, Fera Ibrahim**

*Mahasiswa Magister Program Studi Biomedik FKUI

**Staf Pengajar di Departemen Mikrobiologi FKUI

ABSTRAK

Penggunaan antibodi poliklonal dalam sistem pendeteksi antigen P24 HIV-1 layak untuk dipertimbangkan mengingat variasi susunan epitop P24 pada berbagai sub tipe HIV-1 berpotensi mengakibatkan kegagalan pengenalan epitop oleh antibodi monoklonal. Antibodi poliklonal yang diperoleh melalui induksi dengan antigen rekombinan berpotensi bereaksi secara non spesifik terhadap protein kontaminan yang terdapat dalam sediaan antigen rekombinan sehingga dapat berpengaruh pada spesifisitas sistem pendeteksi antigen.

Pada penelitian sebelumnya diperoleh informasi mengenai reaksi non spesifik serum anti P24 HIV-1 poliklonal yang dihasilkan melalui imunisasi kelinci, khususnya terhadap antigen E.coli dan BSA. Oleh karena penelitian ini, maka diteliti efek purifikasi dengan kromatografi afinitas dalam menghilangkan reaktivitas non spesifik antara serum anti P24 dengan E.coli dan BSA. Dampak ini dinilai dengan menggunakan teknik sandwich ELISA.

Purifikasi dilakukan dengan menggunakan dua kolom kromatografi afinitas dengan ligan E.coli pada kolom pertama dan ligan P24 rekombinan HIV-1 pada kolom kedua. CnBr -sepharose digunakan sebagai matriks. Proses elusi menggunakan glycine HCl, pH 2,7. Eluen hasil purifikasi dikonfirmasi dengan teknik SDS PAGE, western blot dan sandwich ELISA pendeteksi antigen P24 HIV-1. Pada SDS PAGE terbentuk pita antara berat molekul 45-116 kDa yang menunjukkan pita antibodi. Pada uji western blot terdapat pita spesifik protein P24 rekombinan HIV-1 dan tidak muncul pita non spesifik terhadap E.coli. Sedangkan pada uji sandwich ELISA, eluen menunjukkan nilai absorbansi yang lebih tinggi dibandingkan dengan kontrol negatif, dan terdapat penurunan nilai absorbansi dibandingkan dengan sistem tanpa antibodi yang dipurifikasi. Nilai absorbansi eluen juga tidak menunjukkan hasil yang berbeda dengan kontrol negatif jika direaksikan dengan antigen E.coli. Namun reaktifitas non spesifik eluen dengan BSA pada sistem sandwich ELISA tidak berbeda dengan reaktifitas serum prepurifikasi. Pada uji western blot dan sandwich ELISA diperoleh pula informasi yang menunjukkan adanya reaksi non spesifik antara antibodi anti-kelinci yang digunakan dengan protein E.coli.

Purifikasi antibodi dengan menggunakan metode kromatografi afinitas telah berhasil dilakukan dengan kondisi optimal pemurnian dan telah diperoleh eluen yang mengandung antibodi terhadap P24 rekombinan HIV-1 yang tidak bereaksi dengan protein E.coli. Reagensia yang digunakan dalam sistem pendeteksi berpotensi menimbulkan ikatan non spesifik yang dapat mengganggu nilai absorbansi, sehingga

sebelum digunakan harus dinilai kelayakannya untuk digunakan dalam sistem diagnostik tertentu.

Kata kunci: purifikasi, antibodi poliklonal, sandwich ELISA

ABSTRACT

Polyclonal antibody may be important to be considered in sandwich ELISA which detected HIV-1 P24 due to a lot of variations in P24 epitope structure. Variations in epitope were the reason for false negative result in diagnostic system with monoclonal antibody. Polyclonal antibody which produced from recombinant antigen could show non specific reaction with contaminant in antigen preparation.

In the previous research, we have already known that our polyclonal antibody in P24 HIV recombinant immunized rabbit serum had non specific reaction with E.coli protein and BSA in sandwich ELISA system for detecting HIV-1 P24 recombinant protein. This was the major reason to purify the antibody with affinity chromatography. Our goal was to reduce the non specific reaction. We used sandwich ELISA to see the effect of purification.

We used two columns affinity chromatography with different ligand in each column and CnBr sepharose as solid support. The first column utilized E.coli protein as ligand and the second one used HIV-1 P24 recombinant protein. We used glycine HCl, pH 2,7 to elute antibody from affinity chromatography column. Eluen from the second column was confirmed with SDS PAGE, western blot and sandwich ELISA. SDS PAGE followed by comassie blue staining showed specific bands between 45-116 kDa molecular weight, which were interpreted as heavy and light chain fragments of antibody. Purified antibody in the second eluen was shown to be reactive with HIV-1 P24 recombinant protein but not E.coli protein by western blot analysis. There was a decline in the absorbance when eluen was used as detection antibody in sandwich ELISA system, compared with the system that utilized pre purified antibody. We also observed there was non specific reaction between the components in sandwich ELISA for detection of HIV-1 P24 recombinant antigen, in that we found the antibody against anti-rabbit IgG which was used in sandwich ELISA system had non specific reaction with E.coli protein.

We concluded that we gained optimal condition in polyclonal antibody purification to reduce non specific reaction between polyclonal antibody to P24 HIV recombinant antigen and E.coli protein. Reagents which used in our sandwich ELISA system potentially caused non specific reaction so we have to consider their application.

Keyword: Purification, polyclonal antibody, sandwich ELISA

Pendahuluan

Pada tahun 2000, empat puluh juta orang terinfeksi HIV dan merupakan penyebab kematian 20 juta orang baik dewasa maupun anak-anak sejak diidentifikasinya virus tersebut pada tahun 1980-an.¹ Oleh karena cepatnya penyebaran infeksi ini, diperlukan suatu tes diagnosis yang dapat dengan akurat mendeteksi timbulnya kasus baru dan mengevaluasi keberhasilan suatu terapi yang dilakukan pada pasien dengan HIV.

Di Laboratorium Mikrobiologi FKUI telah dikembangkan teknik pendeteksi antigen P24 rekombinan HIV-1 berdasarkan sistem sandwich ELISA melalui penelitian yang dilakukan Apriliana E, *et al.* Masalah yang timbul yaitu terdapat ikatan non spesifik antara serum kelinci yang merupakan antibodi pendeteksi pada sistem dengan antigen lain, yang diduga protein *E.coli*. Ikatan non spesifik ini meningkatkan nilai absorbansi sistem sehingga mengganggu interpretasi hasil.²

Antibodi yang digunakan dalam pengembangan sistem sandwich ELISA pendeteksi antigen rekombinan P24 HIV-1 ini adalah antibodi poliklonal yang berasal dari marmut dan kelinci pasca imunisasi dengan protein P24 rekombinan HIV-1. Kemungkinan terdapat antibodi non spesifik terhadap protein tersebut besar karena pertama, antibodi terbentuk oleh adanya protein non spesifik yang mungkin saja terdapat dalam preparasi antigen rekombinan. Protein rekombinan yang digunakan untuk imunisasi telah melalui proses ekspresi pada bakteri sehingga dikhawatirkan protein bakteri pengeksresi tersebut masih terdapat pada larutan yang diinjeksikan ke hewan coba. Kedua, pada penelitian Apriliana E, *et al* diperoleh informasi bahwa terdapat infeksi pada kelinci yang digunakan dalam uji coba.² Oleh karena itu diperlukan suatu metode untuk memurnikan antibodi poliklonal dalam sistem sandwich ELISA ini. Pemurnian bertujuan untuk menghilangkan antibodi yang dapat mengenali antigen lain selain antigen P24 rekombinan HIV-1 sehingga metode ELISA yang dikembangkan dapat lebih spesifik.

Berdasarkan hal ini, maka dalam penelitian dilakukan purifikasi antibodi poliklonal sebagai reagensia sistem sandwich ELISA pendeteksi protein P24 HIV-1. Hasil penelitian ini diharapkan dapat digunakan dalam pengembangan metode diagnosis infeksi HIV-1 pendeteksi protein P24 sehingga dapat mengurangi ketergantungan penggunaan kit komersial yang berasal dari luar Indonesia.

Metode

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental dengan menggunakan strategi penelitian: (1) Uji reaktivitas serum kelinci dan marmut yang digunakan terhadap protein P24 rekombinan HIV-1, (2) Identifikasi ikatan nonspesifik terhadap protein *E.coli* BL21 dan BSA pada serum kelinci dan marmut dengan sistem sandwich ELISA pendeteksi protein P24 rekombinan HIV-1, (3) Purifikasi antibodi kelinci spesifik terhadap protein P24 rekombinan HIV-1 menggunakan kromatografi afinitas dengan ligan *E.coli* dan protein P24 rekombinan, (4) Konfirmasi antibodi hasil purifikasi dengan uji SDS PAGE, Western Blot, dan Sandwich ELISA pendeteksi antigen P24 rekombinan HIV-1

Antigen P24 Rekombinan HIV-1

Antigen rekombinan P24 HIV-1 diperoleh dari laboratorium FKUI berdasarkan penelitian Apriliana, E *et al.* Pembuatan antigen rekombinan melalui beberapa tahap penelitian, yaitu pengklonaan, transformasi plasmid pada *E. coli*, ekspresi protein, dan purifikasi dengan *Ni-NTA System*.

Antibodi Poliklonal terhadap Antigen P24 Rekombinan HIV-1

Antibodi terhadap antigen P24 rekombinan HIV-1 diperoleh dari laboratorium dan penelitian yang sama. Antibodi diproduksi di kelinci dan marmut dengan menggunakan teknik *Freund's adjuvant complete* dan *incomplete*.

SDS PAGE dan Western Blot

Elektroforesis antigen P24 rekombinan HIV-1 dilakukan sebanyak 100 ng dalam 5 μ L PBS 1x (berdasarkan optimasi penelitian terdahulu) dengan metode SDS-PAGE 12%, sedangkan elektroforesis hasil purifikasi dilakukan dengan menguji 10 μ L eluen dengan konsentrasi gel 10%. Sebelum dilakukan elektroforesis, protein ditambahkan 2x larutan dapar pewarna sampel (50 mM Tris HCl, pH 6,8, 2% SDS, 0,1% Bromphenol Blue, 10% Glycerol) yang mengandung 200 mM DTT dalam jumlah yang sama, kemudian dipanaskan pada suhu 95-100 °C selama 5 menit. Elektroforesis dilakukan pada voltase 150 volt selama kurang lebih 1 jam. Pola pita protein dapat diamati jika gel diwarnai dengan larutan pewarna biru *Coomasie* (90 ml H₂O : metanol [1 : 1], 10 ml asam asetat glasial dan 0,25 gr Brilliant Blue G) dengan penggoyangan pelan selama 10 menit. Warna yang berlebihan kemudian dihilangkan dengan larutan pelepas warna biru *Coomasie* (5% metanol, 7% asam asetat glasial dan 88% H₂O) juga dengan penggoyangan pelan selama kurang lebih satu hari.

Proses transfer dilakukan secara *semi-dry* pada gel yang tidak diwarnai ke membran *Hybond-C*. Proses transfer dilakukan dengan membuat susunan: kertas *Whatman* - membran *Hybond C* - gel - kertas *Whatman* dari arah kutub negatif ke kutub positif alat *Semi Dry Transfer* (BioRad). Proses transfer berjalan dengan larutan dapar transfer (2,5 gr Glisin, 5,8 gram Tris Base, 200 mL methanol dan H₂O hingga volume akhir 1 L, pH 8.3), pada tegangan 15 volt selama lebih kurang 1 jam.

Dilakukan blok pada kertas nitroselulosa selama 24 jam pada suhu 4°C dengan menggunakan Tween 20 0,1%, gelatin 0,5% dalam 1x PBS. Hal ini bertujuan untuk menghindari terjadinya proses ikatan non spesifik antara antibodi dengan antigen lain.

Tahap pencucian membran menggunakan larutan dapar pencuci dengan PBS-Tween. Serum kelinci dan marmut diencerkan dalam larutan dapar pengencer (0,05% Tween 20 dan gelatin 0,025% dalam 1xPBS). Serum kelinci dengan pengenceran 1:250 dan serum marmut dengan pengenceran 1:2000 (konsentrasi sesuai dengan optimasi penelitian terdahulu) diberikan pada masing-masing membran yang telah mengandung antigen P24 rekombinan HIV-1. Kemudian ditambahkan antibodi kedua yaitu antibodi anti-IgG kelinci untuk serum kelinci dan antibodi anti-IgG marmut untuk serum marmut. Antibodi kedua tersebut berkonjugasi dengan biotin dan diencerkan dengan pengenceran 1:5000 dalam larutan dapar pengencer. Dilakukan penambahan streptavidin dan larutan substrat yang mengandung 3 mg

diaminobenzidin (DAB) dan H₂O₂ 30% dalam 1xPBS 5mL, kemudian diinkubasi dalam ruang gelap selama 10 menit. Hasil positif akan ditunjukkan dengan pita berwarna merah hasil oksidasi dari diaminobenzidin.

Sandwich ELISA

Imunoplat (Limbro/Titertek) dilapisi dengan serum marmut pasca imunisasi antigen P24 rekombinan HIV-1 dengan konsentrasi 1:2000 dalam larutan dapar pelapis (larutan mengandung 0,1 M dapar karbonat, pH 9,6) sebanyak 100 µL setiap sumur plat. Plat diinkubasi pada suhu 4°C selama 24 jam. Larutan dapar pemblok (BSA 5% dalam PBS1x) ditambahkan sebanyak 200 µL setiap sumur tersebut, kemudian diinkubasi selama 2 jam pada suhu 37°C. Sebanyak 5 ng antigen P24 rekombinan HIV-1 dalam 100 µL larutan dapar pelarut ditambahkan di setiap sumur. Plat diinkubasi pada suhu 37°C selama 1 jam. Plat kemudian dicuci dengan larutan dapar pencuci (0,05 % Tween 20 dalam PBS 1x) 200 µL/sumur sebanyak 5 kali pencucian. Serum kelinci pasca imunisasi antigen P24 rekombinan HIV-1 dengan konsentrasi 1:250 dalam larutan dapar pelarut (BSA 0,25%, 0,05% Tween 20 dalam PBS 1x) ditambahkan sebanyak 100µL tiap sumur. Plat diinkubasi selama 1 jam pada suhu 37°C. Plat dicuci dengan larutan dapar pencuci sebanyak 5 kali pencucian. Antibodi anti IgG kelinci yang berlabel biotin dengan konsentrasi 1:5000 dalam larutan dapar pelarut ditambahkan sebanyak 100µL tiap sumur. Plat diinkubasi selama 1 jam pada suhu 37°C. Plat dicuci dengan larutan dapar pencuci sebanyak 5 kali pencucian. Streptavidin ditambahkan ke dalam plat dengan pengenceran 3:1000 dalam dapar pelarut sebanyak 100µL tiap sumur. Plat diinkubasi selama 1 jam pada suhu 37°C. Plat dicuci dengan larutan dapar pencuci sebanyak 5 kali pencucian. Dua ratus µL substrat (8mg OPD dalam 20 mL 0,05 larutan dapar fosfat-sitrat, 8µL 30% H₂O₂) ditambahkan tiap sumur. Plat diinkubasi selama 10 dan 20 menit pada suhu ruangan. Absorbansi dibaca pada menit ke-10 dan 20 dengan Microplate Reader 550, Biorad pada panjang gelombang 450 nm.

Purifikasi dengan Menggunakan Kromatografi Afinitas

PURIFIKASI DENGAN MENGGUNAKAN MENGGUNAKAN CnBr
SEPHAROSE DENGAN LIGAN *E. COLI*

Cn-Br Sepharose Activated For Fast Flow (Pharmacia) sebanyak 0,286 gram ditimbang, kemudian dicampurkan dengan 1 mL larutan 1mM HCL dingin dan diinkubasi di atas permukaan es selama 15 menit. Larutan ini dicuci dengan sentrifugasi 2000 rpm pada suhu ruang selama menggunakan 19 mL 1mM HCL, sebanyak 3 kali pencucian. Pelet *E.coli* BL-21 yang telah ditambahkan PBS 1x sebanyak 1 mL dilarutkan dalam 0,0572 mL larutan perekat ligan (0,1 M NaHCO₃ dan 0,5 M NaCl, pH 8,3). Campuran ligan *E.coli* tersebut ditambahkan ke dalam medium, dan digoyang selama 1 jam pada suhu ruang. Larutan dicuci dengan 5 mL larutan dapar perekat ligan. Setelah itu dilakukan blok dengan 1 mL larutan pemblok (0,1 M Tris HCl, pH 8). Campuran diinkubasi pada suhu ruangan selama 2 jam. Campuran dicuci dengan 5 mL larutan dapar natrium asetat (0,1 M dapar asetat dan 0,5 M NaCl, pH 4) dan 5 mL larutan Tris HCL (0,1 M Tris HCl, 0,5 M NaCl, pH 8) secara bergantian sebanyak 3 kali pencucian. Campuran yang telah dicuci di

pindahkan ke kolom *syringe* 5 mL yang telah diberi penyaring 0,22 μm di ujung bawahnya. Serum kelinci dilewatkan sebanyak 1 ml melalui filter 0,22 μm ke medium yang ada pada kolom. Larutan yang keluar dari kolom ditampung. Kolom dicuci dengan larutan dapar pengikat (75 mM Tris HCl, pH 8). Larutan yang keluar dari kolom ditampung. Tiga mL larutan dapar pengelusi (100 mM glicin HCl dan 0,5 M NaCl, pH 2,7) dilewatkan ke dalam kolom. Larutan yang keluar dari kolom ditampung menggunakan tabung yang telah berisi 0,5 mL 0,1 M Tris HCl, pH 8.

PURIFIKASI DENGAN MENGGUNAKAN CnBr SEPHAROSE DENGAN LIGAN PROTEIN P24 REKOMBINAN HIV-1

Prosedur yang sama dilakukan seperti pada preparasi kolom dengan ligan *E.coli*. Namun serum yang dilewatkan dalam kolom ini adalah 600 μL larutan tampungan pasca melewati serum kelinci ke kolom yang mengandung ligan *E.coli* (*flow through* kolom ligan *E.coli*) melalui filter 0,22 μm ke medium yang ada dalam kolom. Larutan yang keluar dari kolom ditampung. Kolom dicuci dengan larutan dapar pengikat (75 mM Tris HCl, pH 8). Larutan yang keluar dari kolom ditampung. Tiga mL larutan dapar pengelusi (100 mM glycine HCl dan 0,5 M NaCl, pH 2,7) dilewatkan ke dalam kolom. Larutan yang keluar dari kolom ditampung menggunakan tabung yang telah berisi 0,5 mL 0,1 M Tris HCl, pH 8.

Presipitasi Protein

Protein hasil purifikasi yang menunjukkan pita tipis pada agar elektroforesis dengan pewarnaan larutan biru comasie dipresipitasi dengan larutan etanol absolut. Sampel protein diambil sebanyak 350 μL , ditambahkan 1000 μL etanol absolut dingin. Larutan tersebut dimasukkan ke dalam pendingin dengan suhu -20°C selama 24 jam. Larutan disentrifugasi pada kecepatan 12000 putaran per menit selama 30 menit. Supernatan dibuang dan pelet dikeringkan. Pelet dipersiapkan untuk elektroforesis selanjutnya.

Hasil

Uji Reaktivitas Serum Kelinci dan Marmut dengan Protein P24 Rekombinan HIV-1

Untuk mengetahui reaktivitas antibodi terhadap antigen protein P24 rekombinan HIV-1, dilakukan uji western blot. Terbentuk pita yang setara dengan berat molekul 24 kDa pada serum marmut dan kelinci pasca imunisasi dengan antigen P24 rekombinan HIV-1. Hal ini menunjukkan antibodi terhadap protein P24 rekombinan HIV-1 yang terdapat dalam serum marmut dan kelinci masih reaktif terhadap antigen tersebut.

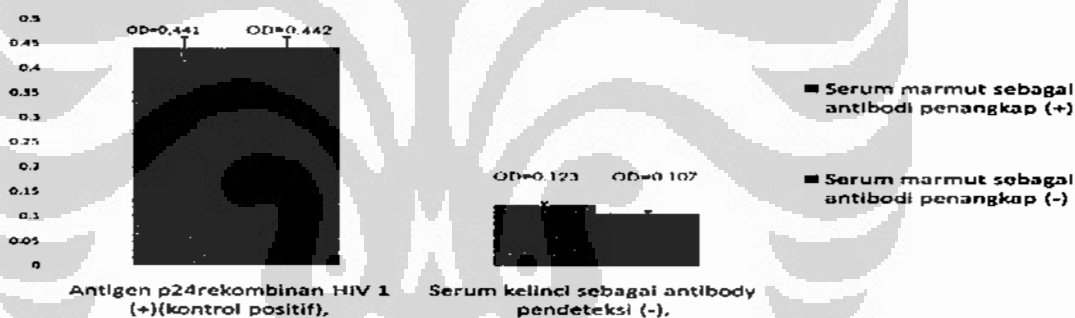
Dilakukan pula pengujian reaktivitas antibodi terhadap antigen protein P24 rekombinan HIV-1 dengan menggunakan teknik ELISA dengan konsentrasi antigen, serum kelinci dan serum marmut berdasarkan optimasi penelitian terdahulu.¹¹ Diperoleh hasil bahwa serum kelinci dan marmut masih reaktif terhadap antigen rekombinan yang dilapis pada plat ELISA, seperti yang tertera pada gambar 1.



Gambar 1. Uji reaktivitas serum kelinci dan marmut dengan antigen P24 rekombinan HIV-1 dengan teknik ELISA.

Identifikasi Reaksi Non Spesifik pada Serum Kelinci dan Marmut dengan Sistem Sandwich ELISA

Serum marmut digunakan sebagai antibodi penangkap dan serum kelinci digunakan sebagai antibodi pendeteksi pada sistem sandwich ELISA yang dikembangkan.



Gambar 2. Uji Sandwich ELISA untuk mencari ikatan non spesifik yang mempengaruhi absorbansinya.

Dari gambar 2, diperoleh hasil bahwa nilai absorbansi pada sistem tanpa serum marmut sebagai antibodi penangkap tidak berbeda dengan nilai absorbansi pada sistem dengan serum marmut (poligon 2 merah). Berdasarkan hal tersebut diperoleh kesimpulan sementara bahwa serum marmut sebagai antibodi penangkap kurang mempengaruhi kerja sistem sandwich ELISA dalam timbulnya ikatan non spesifik.

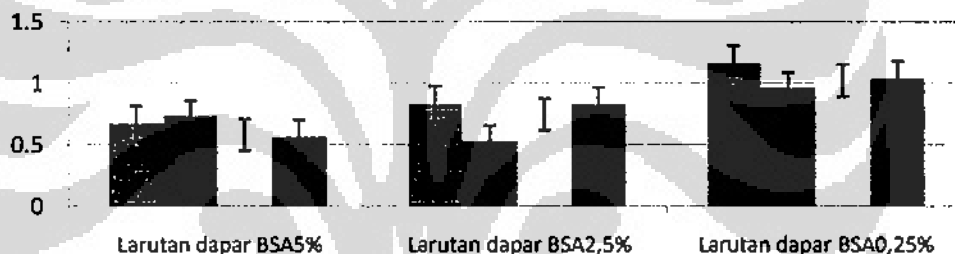
Berbeda dengan serum marmut, serum kelinci memiliki peran yang penting dalam sistem. Penghilangan keberadaan serum kelinci menurunkan nilai absorbansi sistem secara bermakna (gambar 2).



Gambar 3. Uji Sandwich ELISA untuk mengetahui reaktivitas serum kelinci dengan protein *E.coli*

Nilai absorbansi sistem dengan perlakuan serum kelinci yang diinkubasi dengan *E.coli* selama 1 jam menunjukkan adanya penurunan dibandingkan dengan sistem tanpa inkubasi (gambar 3).

Perlakuan berikutnya adalah inkubasi serum kelinci dengan larutan dapar pelarut yang mengandung BSA dengan konsentrasi 5% dan 2,5%. Kemudian dilakukan pengukuran nilai absorbansi dengan sistem sandwich ELISA yang akan dikembangkan. Tujuan dari perlakuan ini untuk mengetahui pengaruh BSA terhadap nilai absorbansi sistem ELISA. Hasil perlakuan ini dapat dilihat pada gambar 4.



Gambar 4. Uji Sandwich ELISA untuk mengetahui perbedaan waktu inkubasi serum kelinci dengan larutan dapar pelarut yang mengandung BSA dengan berbagai konsentrasi. Poligon berwarna biru menunjukkan serum kelinci tidak diinkubasi dengan dapar pelarut, poligon berwarna merah menunjukkan serum kelinci diinkubasi 1 jam, poligon berwarna hijau diinkubasi 2 jam, poligon berwarna ungu diinkubasi 3 jam.

Perbedaan konsentrasi BSA yang digunakan pada larutan pelarut serum kelinci menunjukkan perbedaan nilai absorbansi. Semakin tinggi konsentrasi BSA yang digunakan semakin rendah nilai absorbansi yang dihasilkan. Hal ini menunjukkan ada pengaruh langsung antara BSA dengan serum kelinci terhadap perubahan nilai absorbansi yang dihasilkan. Namun waktu inkubasi tidak mempengaruhi nilai absorbansi yang dihasilkan.

Purifikasi Antibodi

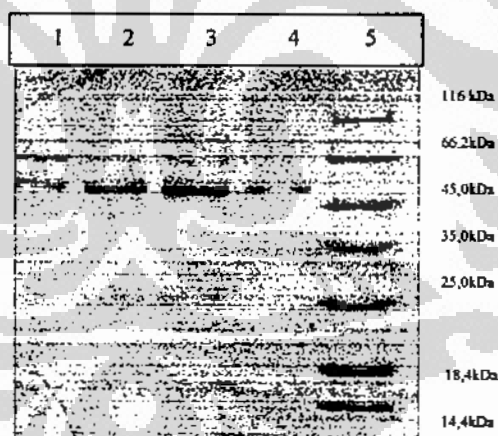
Purifikasi antibodi dilakukan terhadap serum kelinci berdasarkan hasil identifikasi ikatan nonspesifik yang telah dilakukan sebelumnya. Purifikasi dengan menggunakan metode afinitas dipilih untuk mendapatkan antibodi yang spesifik terhadap protein P24 rekombinan. Purifikasi ini menggunakan CNBr *sepharose activated for fast flow* (Pharmacia). Purifikasi menggunakan 2 kolom dengan ligan yang berbeda. Pada kolom pertama diikat ligan *E.coli* BL21 pasca sonikasi,

sedangkan pada kolom kedua diikatkan ligan protein P24 rekombinan. Dari 1 ml serum kelinci yang dilewatkan pada kolom pertama, diperoleh 700 μ L serum kelinci yang dapat dilewatkan kembali ke dalam kolom kedua. Hanya 600 μ L saja yang kemudian dilewatkan ke dalam kolom kedua, sisanya disimpan pada suhu -80°C . Kolom pertama dan kedua dielusi menggunakan larutan glycine HCl, pH 2,7. Dari hasil purifikasi ini diperoleh 2,5 mL eluen dari kolom pertama, dan 5x2,5 mL eluen dari kolom kedua. Setiap tabung hasil elusi disimpan dalam 500 μ L Tris HCl, pH 8,0.

Eluen dari kolom pertama dan kedua dialiquot berdasarkan waktu inkubasi larutan dapar pengelusi dalam kolom. Tabung pertama hasil inkubasi 1 jam (inkubasi pertama), tabung kedua hasil inkubasi 2 jam setelah inkubasi pertama (inkubasi kedua), tabung ketiga hasil inkubasi 18 jam setelah inkubasi kedua (inkubasi ketiga), tabung keempat hasil inkubasi 1 jam setelah inkubasi ketiga (inkubasi keempat), dan tabung kelima hasil inkubasi 2 jam setelah inkubasi keempat (inkubasi kelima).

Konfirmasi Antibodi Hasil Purifikasi

Sebelum dilakukan elusi, dilakukan optimasi pencucian kolom. Hasilnya diperoleh bahwa proses pencucian yang dilakukan pada kolom ini sebanyak 6x 5mL. Setelah dipastikan air cucian tidak menunjukkan adanya pita pada uji elektroforesis SDS PAGE, dilakukan elusi dengan menggunakan larutan glycine HCl, pH 2,7.

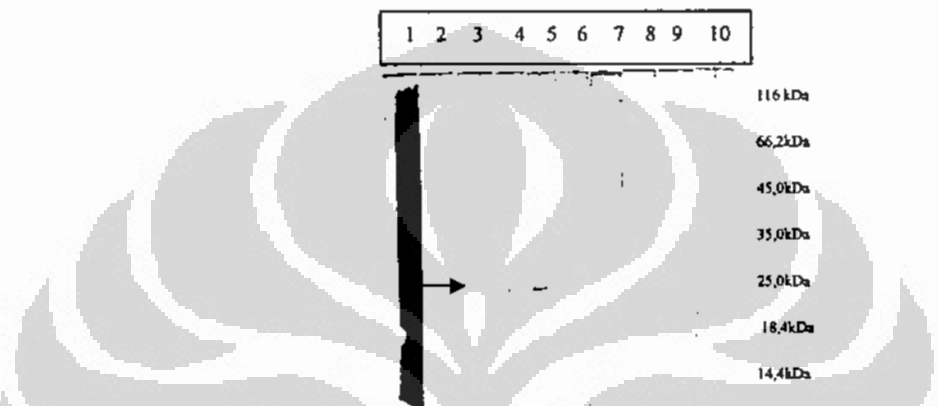


Gambar 5. Hasil SDS PAGE eluen kolom P24 rekombinan HIV-1. 1. Elusi pertama, inkubasi 1 jam kolom ligan P24 rekombinan HIV-1 dengan larutan pengelusi, 2. Elusi kedua, inkubasi 2 jam kolom ligan P24 rekombinan HIV-1 dengan larutan pengelusi, 3. Elusi ketiga, inkubasi 18 jam kolom ligan P24 rekombinan HIV-1 dengan larutan pengelusi, 4. Elusi keempat, tanpa diinkubasi, setelah dilakukan elusi ketiga, 5. Marka protein

Hasil purifikasi antibodi dikonfirmasi dengan menggunakan elektroforesis, Western Blot dan ELISA. Dari konfirmasi keberadaan antibodi dengan pewarnaan Comassie Blue SDS PAGE dan presipitasi protein dengan etanol absolut, diperoleh bahwa hasil purifikasi antibodi kelinci menunjukkan pita spesifik rantai ringan dan rantai berat antibodi. Hal ini terbukti dengan terbentuknya pita-pita tipis antara 45 kDa dan 116 kDa (gambar 5 lajur 1-4)

Untuk meyakinkan bahwa pita yang muncul tersebut adalah antibodi spesifik terhadap protein P24 rekombinan HIV-1, maka dilakukan uji Western Blot. Protein yang dielektroforesis adalah P24 rekombinan HIV-1 dan *E.coli* BL21. Serum kelinci dan hasil elusi diencerkan dalam larutan dapar pelarut sebesar 1/250

Dari hasil western blot diperoleh bahwa eluen elusi kedua, ketiga dan keempat menunjukkan pita (gambar 6, lajur 3,4,5). Hal ini menunjukkan bahwa eluen tersebut reaktif terhadap P24 HIV-1 rekombinan. Pada eluen hasil elusi pertama dan kelima tidak terdapat pita (gambar 6, lajur 2, 6).

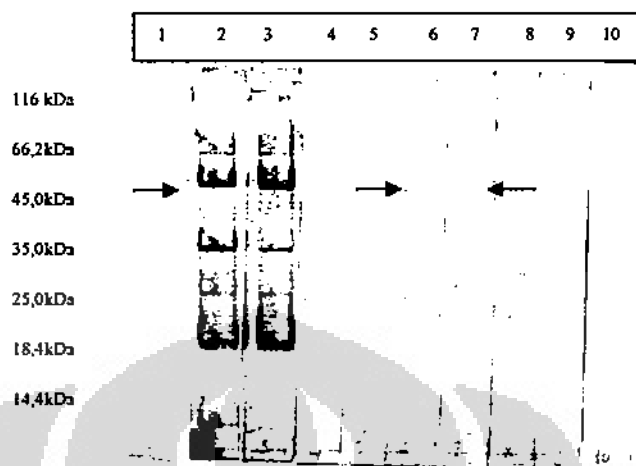


Gambar 6. Uji western Blot untuk menguji reaktifitas antibodi kelinci dalam eluen pasca purifikasi kolom P24 rekombinan HIV-1 dengan melapisi kertas nitroselulosa dengan antigen P24 rekombinan dan *E.coli*. Western Blot Antigen P24 HIV-1 rekombinan HIV-1 dengan: lajur 1. Serum kelinci pasca imunisasi, prepurifikasi, lajur 2. Hasil elusi pertama, lajur 3. Hasil elusi kedua, lajur 4. Hasil elusi ketiga, lajur 5. Hasil elusi keempat, lajur 6. Hasil elusi kelima. Lajur 7. Marka protein. Antigen *E.coli* BL21 pada membran nitroselulosa diberi: lajur 8. Hasil elusi pertama, lajur 9. Hasil elusi kedua, lajur 10. Hasil elusi ketiga.

Hasil western blot dengan antigen *E.coli* menunjukkan pita non spesifik yang terletak antara berat protein 18,4 kDa dan 25 kDa di kertas nitroselulosa yang diberi eluen hasil elusi pertama, kedua dan ketiga (gambar 6, lajur 8,9,10). Pada uji western blot (gambar 7), pita yang muncul pada berat molekul antara 18,4-25 kDa pada uji sebelumnya muncul kembali (lajur 2-10).

Pada kertas nitroselulosa yang diberi eluen dari kolom *E.coli* hasil elusi kedua dan ketiga terdapat pita antara berat protein 45 kDa dan 116 kDa (gambar 7 lajur 6 dan 7). Pita tersebut kemungkinan terbentuk akibat ikatan spesifik antara antibodi terhadap *E. Coli* dengan antigennya.

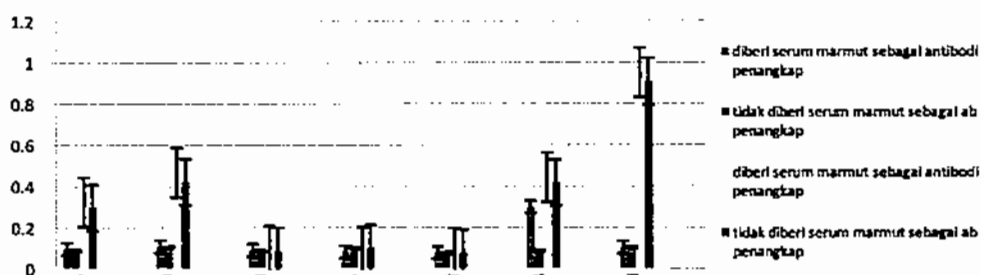
Hasil elusi pada kolom P24 rekombinan HIV-1 menunjukkan tidak terdapat interaksi dengan antigen *E.coli* BL 21. Hal ini dibuktikan dengan tidak terbentuknya pita spesifik dari hasil uji western blot (gambar 7 lajur 4).



Gambar 7. Uji western blot untuk mengetahui reaktifitas eluen pasca purifikasi dengan antigen *E.coli* BL21 dan pengaruh anti-antibodi kelinci pada antigen *E.coli*. 1. Marka protein. Western Blot *E.coli* BL21 dengan: 2. Serum kelinci pre imunisasi-pre purifikasi, 3. Serum kelinci pasca imunisasi-pre purifikasi, 4. Hasil elusi kedua, 5. Hasil elusi pertama dari kolom *E.coli*, 6. Hasil elusi kedua dari kolom *E.coli*, 7. Hasil elusi ketiga dari kolom *E.coli*, 8. Hasil elusi keempat dari kolom *E.coli*, 9. Hasil elusi keempat dari kolom *E.coli*, 10. Tidak diberikan serum kelinci atau eluen.

Untuk membuktikan bahwa eluen hasil purifikasi telah cukup murni, dilakukan uji sandwich ELISA. Hasil diperoleh bahwa diperoleh penurunan nilai absorbansi yang cukup berarti antara eluen hasil purifikasi dengan serum kelinci prepurifikasi (gambar 8 poligon 2-biru dibandingkan dengan poligon 2-hijau). Nilai absorbansi eluen juga diatas nilai kontrol negatifnya (gambar 8 poligon 1-biru). Inkubasi *E.coli* dengan eluen juga tidak menurunkan nilai absorbansi dalam sistem sandwich ELISA, tetapi nilai tersebut malah menjadi tinggi (gambar 8 poligon 6-biru). Hal ini juga diperkuat dengan nilai absorbansi eluen yang kurang lebih tetap pada saat dapar pemblok diberi *E.coli* (gambar 8 poligon 7-merah dan biru). Dari gambar 8 juga disimpulkan bahwa komponen larutan dapar pemblok, antigen, antibodi anti-antibodi kelinci tidak menghasilkan nilai absorbansi yang signifikan jika komponen tersebut tidak membentuk sistem sandwich ELISA yang utuh (poligon 3,4,5).

Dari hasil optimasi untuk mengidentifikasi ikatan non-spesifik pada sistem sandwich ELISA, diperoleh informasi bahwa BSA yang merupakan komponen utama larutan dapar pelarut dan pemblok mempengaruhi nilai absorbansi sistem. Pengaruh ikatan nonspesifik terhadap BSA ini belum sepenuhnya dapat dihilangkan dengan proses pencucian pada kolom purifikasi.



Gambar 8. Uji Sandwich ELISA untuk membandingkan nilai absorbansi yang dihasilkan eluen hasil purifikasi menggunakan ligan P24 rekombinan HIV-1 dengan serum kelinci prepurifikasi. Sebagai antibodi pendeteksi digunakan eluen hasil purifikasi kolom P24 rekombinan HIV-1 yang diinkubasi dengan larutan pengelusi selama 18 jam dengan pengenceran 1/50 dan serum kelinci prepurifikasi dengan pengenceran 1/250. 1. Tanpa diberikan antigen rp24 HIV 1 (kontrol negatif), 2. Diberikan antigen rp24 HIV 1 (kontrol positif), 3. Tanpa diberikan serum kelinci sebagai antibodi pendeteksi, 4. Tanpa diberikan antigen rp24 HIV 1 dan serum kelinci sebagai antibodi pendeteksi, 5. Tanpa diberikan antigen rp24 HIV 1, serum kelinci sebagai antibodi pendeteksi, dan anti IgG kelinci, 6. Serum kelinci diinkubasi dengan *E.coli* (konsentrasi 1/250) selama 1 jam, 7. Larutan dapar pemblok BSA 5% diinkubasi dengan *E.coli* (konsentrasi 5%) selama 1 jam,

Diskusi

Pemeriksaan dengan sensitivitas tinggi diperlukan karena salah satu tujuan pengembangan sistem sandwich ELISA pendeteksi P24 HIV-1 untuk penapisan awal infeksi HIV-1. Penggunaan antibodi poliklonal pada sistem ELISA tidak langsung mempunyai beberapa keuntungan dalam hal sensitivitas. Pohanka M, et al (2008) membandingkan sistem ELISA tidak langsung pendeteksi antigen *F.tularensis* yang menggunakan antibodi poliklonal dengan antibodi monoklonal. Disimpulkan bahwa dengan menggunakan antibodi poliklonal sistem tersebut mampu mendeteksi antigen dengan pengenceran yang lebih tinggi dibandingkan menggunakan antibodi monoklonal. Selain itu, ambang batas pendeteksi (*limit of detection*) sistem dengan antibodi poliklonal lebih rendah.³ Namun demikian, pemeriksaan dengan sistem sandwich ELISA ini harus dikonfirmasi dengan pemeriksaan lain sesuai dengan alur pemeriksaan yang telah ditetapkan WHO.¹⁷

Uji sandwich ELISA yang dilakukan untuk mendeteksi reaksi non spesifik pada serum kelinci melalui proses inkubasi serum kelinci dengan protein *E.coli* sebelum digunakan dalam sistem (gambar 3) menunjukkan bahwa dalam serum kelinci terdapat antibodi terhadap protein *E.coli* yang jika diberikan antigennya maka terjadi proses netralisasi. Oleh karena itu, jika serum kelinci diberikan pada sistem yang menggunakan antibodi poliklonal sebagai antibodi penangkap dan antigen rekombinan hasil ekspresi di bakteri *E.coli*, nilai absorbansi yang ditimbulkan akan lebih rendah jika dibandingkan dengan sistem tanpa inkubasi serum pendeteksi dengan *E.coli*.

Purifikasi serum kelinci pada penelitian ini menggunakan teknik kromatografi afinitas, bertujuan menghilangkan pengaruh antibodi terhadap protein *E.coli* yang terbentuk akibat proses ekspresi protein rekombinan P24.² Penelitian Bergmann-

Leitner ES menyimpulkan teknik kromatografi afinitas dan presipitasi merupakan metode terbaik untuk memurnikan antibodi dalam serum yang berasal dari kelinci.⁴

Metode kromatografi afinitas yang dipilih pada penelitian ini menggunakan *CnBr Sepharose Activated For Fast Flow (Pharmacia)* karena makromolekul yang memiliki gugus amino umumnya mudah diimobilisasi pada agarose melalui metode aktivasi *CnBr*.⁵ Cyanogen bromida mempunyai kapasitas yang tinggi dalam pelekatan ligan.⁶ Kromatografi afinitas ini memiliki keunggulan karena bersifat eluen yang diperoleh bersifat spesifik terhadap ligan P24 rekombinan HIV-1, sedangkan kerugiannya adalah proses elusi yang dapat mengubah konformasi protein hasil elusi.

Pemilihan ligan *E.coli* untuk dilekatkan dalam kolom purifikasi berdasarkan hasil optimasi yang mengindikasikan terbentuknya protein non spesifik antara serum kelinci dan antigen *E.coli*. Hal ini dapat terjadi karena proses produksi antigen rekombinan tersebut.^{2,3} Pada penelitian Apriliana E, et al, pada proses produksi telah dilakukan ekspresi gen P24 rekombinan HIV-1 dalam bakteri *E.coli* BL21. Protein yang berasal dari *E.coli* ini menjadi protein non spesifik pada larutan protein rekombinan yang diinjeksikan ke hewan coba. Hewan coba dapat membentuk antibodi terhadap protein tersebut.²

Pada penelitian ini digunakan larutan dapar pengelusi dengan pH 2,7, di bawah titik isoelektrik antibodi, sehingga dapat memutus ikatan non-kovalen antara antigen dan antibodi. Dampak negatif penggunaan pH yang ekstrim pada antibodi adalah mengubah bentuk antibodi tersebut menjadi 'bentuk T'.⁷ Perubahan konformasi antibodi ini dikhawatirkan dapat menurunkan sinyal absorbansi yang dihasilkan sistem sandwich ELISA. Untuk mengurangi hal ini, dilakukan penambahan Tris HCL pH 8 pada saat menampung hasil elusi dengan tujuan menetralkan pH yang asam.^{4,8}

Pada uji western blot, eluen hasil elusi pertama tidak menunjukkan pita spesifik terhadap protein P24 HIV-1 (gambar 6, lajur 2) karena waktu inkubasi larutan dapar pengelusi belum cukup untuk melepaskan ikatan antigen-antibodi pada kolom, sehingga konsentrasi antibodi yang terelusi masih sedikit. Sedangkan eluen hasil elusi kelima tidak menunjukkan pita (gambar 6, lajur 6) karena diperkirakan antibodi pada kolom telah terelusi seluruhnya pada proses elusi sebelumnya.

Pita non spesifik yang terbentuk pada western blot *E.coli* (gambar 7) dipastikan bukan karena eluen yang digunakan karena pita tersebut tetap ada pada kertas nitroselulosa yang tidak diberi serum atau eluen. Timbulnya pita non spesifik ini diduga karena reaksi langsung antara anti-antibodi kelinci berlabel biotin dengan protein *E.coli*. Hal ini diduga dapat terjadi karena tidak maksimalnya proses pemurnian antibodi tersebut saat diproduksi. Penghilangan ikatan non-spesifik ini dapat dilakukan dengan peningkatan konsentrasi deterjen non ionik pada larutan dapar pencuci dan dapar pelarut. Deterjen ini dapat menghilangkan interaksi nonspesifik antar protein.⁹

Pada uji sandwich ELISA yang menginkubasi eluen dengan protein *E.coli* terlebih dulu sebelum digunakan dalam sistem (gambar 8 poligon 6-biru) menunjukkan adanya peningkatan nilai absorbansi. Hal ini terjadi mungkin karena masih adanya reaksi antara antibodi-anti kelinci dengan protein *E.coli* yang ditangkap oleh antibodi penangkap. Peningkatan sinyal ini sekaligus membuktikan bahwa tidak

terjadi proses netralisasi eluen dengan protein *E.coli* sehingga dapat disimpulkan bahwa purifikasi telah menghilangkan antibodi terhadap *E.coli* pada serum kelinci.

Melalui uji sandwich ELISA dan Western Blot, serum kelinci yang diperoleh sebelum diimunisasi antigen P24 rekombinan HIV-1 memperlihatkan adanya antibodi terhadap *E.coli*. Hal ini dapat terjadi karena infeksi bakteri secara alamiah. Dugaan ini diperkuat dengan penelitian Apriliana yang menyebutkan bahwa terdapat infeksi pada kelinci yang digunakan.²

Kesimpulan

Purifikasi antibodi dengan menggunakan *Cn-Br Sepharose Activated For Fast Flow* (Pharmacia) sebagai matriks telah berhasil dilakukan dengan kondisi optimal pemurnian dan telah diperoleh eluen yang mengandung antibodi terhadap P24 rekombinan HIV-1 yang tidak bereaksi dengan *E.coli*. Untuk mendeteksi antigen rekombinan P24 HIV-1 dengan sistem sandwich ELISA yang dikembangkan, diperlukan serum kelinci hasil purifikasi dari kolom P24 rekombinan tanpa diencerkan. Reagensia yang digunakan dalam sistem pendeteksi berpotensi menimbulkan ikatan non spesifik yang dapat mengganggu nilai absorbansi, sehingga sebelum digunakan harus dinilai kelayakannya untuk digunakan dalam sistem diagnostik tertentu.

Daftar Pustaka

1. Burke DS, McCutchan FE. *Global distribution of human immunodeficiency virus-1 clade*. In: De Vita VT, Hellman S, Rosenberg SA, editors. *AIDS: etiology, diagnosis, treatment and prevention*. 4th ed. Philadelphia: Lippincott-Raven; 1997: 119-25.
2. Apriliana E. Produksi antibodi pokliklonal yang spesifik terhadap antigen P24 Human Immunodeficiency I (HIV-1) untuk pengembangan sistem diagnostik infeksi HIV-1. Tesis. Program Pasca Sarjana, Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia. Jakarta 2008.
3. Pohanka M, et al. *ELISA detection of Francisella tularensia using polyclonal and monoclonal antibodies*. *Defence Science Journal* 2008; 58(5): 698-702.
4. Bergmann Leitner SE, et al. *Evaluation of immunoglobulin purification methods and their impact on quality and yield of antigen-specific antibodies*. *Malaria Journal* July 2008, 7:129.
5. Johnstone A, Thorpe R. *Affinity chromatography and immunoprecipitation*. In: *Immunochemistry In Practice*. 2nd ed. Blackwell Scientific Publications. London. 1987:207-23.
6. Harlow E and Lane D. *Antibodies- A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory. 1988: 511-18, 532.
7. Bagchi P dan Birnbaum SM. *Effect of pH on the adsorption of immunoglobulin G on anionic poly(vinyltoluene) model latex particles*. *Journal of Colloid and Interface Science* October 1981; 83(2):460-78.

8. *GE Healthcare. Afinity Purification Handbook*. Diunduh dari: www.gehealthcare.com. Diakses pada tanggal 12 Juni 2008.
9. KPL. ELISA. Diunduh dari: www.kpl.com. Diakses pada tanggal 12 Juni 2008.

