

**PRODUKSI ANTIBODI ANTI-NS1 DENGUE PADA
KELINCI DAN PELABELAN DENGAN
HORSERADISH PEROKSIDASE**

TESIS

PAISAL

NPM: 0806476753



**UNIVERSITAS INDONESIA
FAKULTAS KEDOKTERAN
PROGRAM MAGISTER ILMU BIOMEDIK
JAKARTA
JUNI 2010**

**PRODUKSI ANTIBODI ANTI-NS1 DENGUE PADA
KELINCI DAN PELABELAN DENGAN
HORSERADISH PEROKSIDASE**

TESIS

Diajukan sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar Magister Biomedik
pada Universitas Indonesia di Jakarta

PAISAL

NPM: 0806476753



**UNIVERSITAS INDONESIA
FAKULTAS KEDOKTERAN
PROGRAM MAGISTER ILMU BIOMEDIK**

JAKARTA

JUNI 2010

HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS

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

Nama : Paisal

NPM : 0806476753

Tanda Tangan :



Tanggal : 18 Juni 2010

HALAMAN PENGESAHAN

Tesis ini diajukan oleh:

Nama : Paisal
NPM : 0806476753
Program Studi : Magister Ilmu Biomedik Kekhususan Mikrobiologi
Judul Tesis : Produksi Antibodi Anti-NS1 Dengue pada Kelinci dan Pelabelan dengan Horseradish Peroksidase

Telah berhasil dipertahankan di hadapan Dewan Penguji dan diterima sebagai bagian persyaratan yang diperlukan untuk memperoleh gelar Magister Biomedik pada Program Studi Magister Ilmu Biomedik, Fakultas Kedokteran, Universitas Indonesia.

DEWAN PENGUJI

Pembimbing I : Dra. Beti Ernawati Dewi, PhD (.....)

Pembimbing II : Dr. T. Mirawati Sudiro, PhD (.....)

Penguji I : Prof.dr. Agus Sjahrurachman, SpMK, PhD(.....)

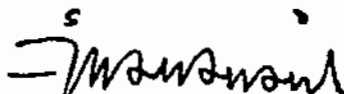
Penguji II : Dr. Alida R. Harahap, SpPK(K), PhD (.....)

Penguji III: : Prof. dr. Mohamad Sadikin, DSc (.....)

Ditetapkan di : Jakarta

Tanggal : 18 Juni 2010

Ketua Program Studi Magister Ilmu Biomedik


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

KATA PENGANTAR

Alhamdulillah rabbil alamin

Atas rahmat dan karunia ALLAH SWT, akhirnya saya dapat menyelesaikan penelitian dan penulisan tesis ini.

Saya mengucapkan terima kasih dan penghargaan kepada Rektor Universitas Indonesia, Prof. Dr. der Soz. Goemilar Rusliwa Soemantri, yang telah memberikan kesempatan kepada saya untuk mengajukan tesis ini.

Rasa hormat dan terima kasih juga saya sampaikan kepada Dr. dr. Ratna Sitompul, SpM(K) dan Prof. dr. Pratiwi Soedharmono, PhD, SpMK selaku Dekan dan Wakil Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia atas kesempatan yang diberikan untuk mengikuti Program S2 Ilmu Biomedik FKUI.

Ucapan terima kasih dan penghargaan kepada Dr. rer. physiol. dr. Septelia Inawati W. dan Dr. rer. nat. Dra. Asmarinah, MS selaku Ketua dan Sekretaris Program Studi S2 Ilmu Biomedik FKUI atas bimbingan yang selalu diberikan sehingga saya dapat menyelesaikan program S2 ini.

Saya menyampaikan terima kasih dan penghargaan kepada Dra. Beti Ernawati Dewi, PhD dan Dr. T. Mirawati Sudiro, PhD selaku pembimbing, atas perhatian, bimbingan, dan dorongan yang diberikan dari awal hingga tahap akhir penelitian dan penulisan tesis ini.

Kepada para pembimbing dan penguji saya, Prof. dr. Agus Sjahrurachman, SpMK, PhD dan dr. Alida R. Harahap, SpPK(K), PhD, dan Prof. dr. Mohamad Sadikin, DSc, saya mengucapkan terima kasih dan penghargaan atas kesediaan beliau membimbing, menguji, dan memberikan saran-saran sehingga saya dapat menyelesaikan penulisan tesis ini.

Kepada Kepala Departemen Mikrobiologi FKUI, dr. Anis Karuniawati, PhD, SpMK, saya mengucapkan terima kasih atas perhatian dan dorongannya untuk menyelesaikan program S2 ini. Kepada Ketua Kekhususan Mikrobiologi, dr. Budiman Bela, SpMK, saya mengucapkan terima kasih atas perhatian dan masukannya. Kepada Staf Pengajar Departemen Mikrobiologi dan Karyawan Laboratorium Mikrobiologi FKUI, saya ucapkan terima kasih atas dukungan dan kerjasama yang telah diberikan selama saya menjalani pendidikan.

**HALAMAN PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI
TUGAS AKHIR UNTUK KEPENTINGAN AKADEMIS**

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

Nama : Paisal
NPM : 0806476753
Program Studi : Magister Ilmu Biomedik
Departemen : Mikrobiologi
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:

Produksi Antibodi Anti-NS1 Dengue pada Kelinci dan Pelabelan dengan Horseradish Peroksidase

berserta 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 sebagai penulis/pencipta dan sebagai pemilik Hak Cipta.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya.

Dibuat di : Jakarta
Pada tanggal : 18 Juni 2010

Yang menyatakan



(Paisal)

ABSTRAK

Nama : Paisal
Program Studi : Ilmu Biomedik
Judul : Produksi Antibodi Anti-NS1 Dengue pada Kelinci dan Pelabelan dengan Horseradish Peroksidase

Insiden penyakit dengue semakin meningkat dalam beberapa dekade terakhir. WHO memperkirakan terjadi 50 juta infeksi dengue di seluruh dunia setiap tahun. Sekitar 500.000 orang dengan demam berdarah dengue (DBD) membutuhkan perawatan di rumah sakit, sebagian besar adalah anak-anak. Sekitar 2,5% diantaranya mengalami kematian. Sampai saat ini belum ada terapi spesifik untuk infeksi dengue. Pengobatan hanya bersifat simptomatik. Walaupun demikian, pada kasus DBD dan DSS, perawatan dini dapat menurunkan angka morbiditas dan mortalitas. Di daerah endemis, gejala klinik sering tidak spesifik dan menyulitkan klinisi untuk membedakannya dengan penyakit demam lain. Untuk itu diperlukan uji laboratorium yang akurat untuk membantu menegakkan diagnosis dini infeksi dengue. Deteksi protein NS1 virus dengue telah dikembangkan sebagai alat diagnostik dini infeksi dengue. Pemeriksaan ini dapat memberikan hasil lebih dini, akurat, dan dengan cara yang lebih murah. Pada penelitian ini dikembangkan IgG anti-NS1 pada kelinci berlabel HRP yang pada akhirnya akan digunakan untuk mendeteksi protein NS1 pada serum pasien terinfeksi dengue. Antibodi hasil pelabelan dapat mendeteksi protein NS1 pada pemeriksaan dot blot dengan tingkat pengenceran 1:1600. Tetapi, hasil pelabelan tidak dapat digunakan untuk mendeteksi protein NS1 menggunakan pemeriksaan ELISA.

Kata kunci: Antibodi Anti-NS1 Dengue, Kelinci, Horseradish Peroksidase

ABSTRACT

Name : Paisal
Study Program : Biomedical Science
Title : Production of Dengue Anti-NS1 Antibody In Rabbit and Labeling with Horseradish Peroxidase

Dengue incidence have been increased in recent decades. WHO estimates 50 million dengue infection every years around the world. About 500.000 people with dengue hemorrhagic fever need hospital care, especially children. About 2,5% among them died. Specific therapy to dengue virus infection is not available. The available therapy is only for symptomatic. Although, in DHF and DSS cases, early symptomatic therapy will reduce morbidity and mortality rate. In endemic area, clinical symptoms often are not specific and difficult to differentiate with others febrile illness. Therefore, laboratory assays are needed to help accurately diagnose dengue infection at early stage. Detection of dengue virus NS1 protein has been used as a diagnostic tool to diagnose early dengue infection. The assay can provide early and accurate result with less expensive cost. In this study, we developed IgG anti-NS1 labeled with HRP. The antibody can detect NS1 protein in dilution 1:1600 on dot blot assay. But, the antibody cannot be used to detect NS1 protein with direct ELISA method.

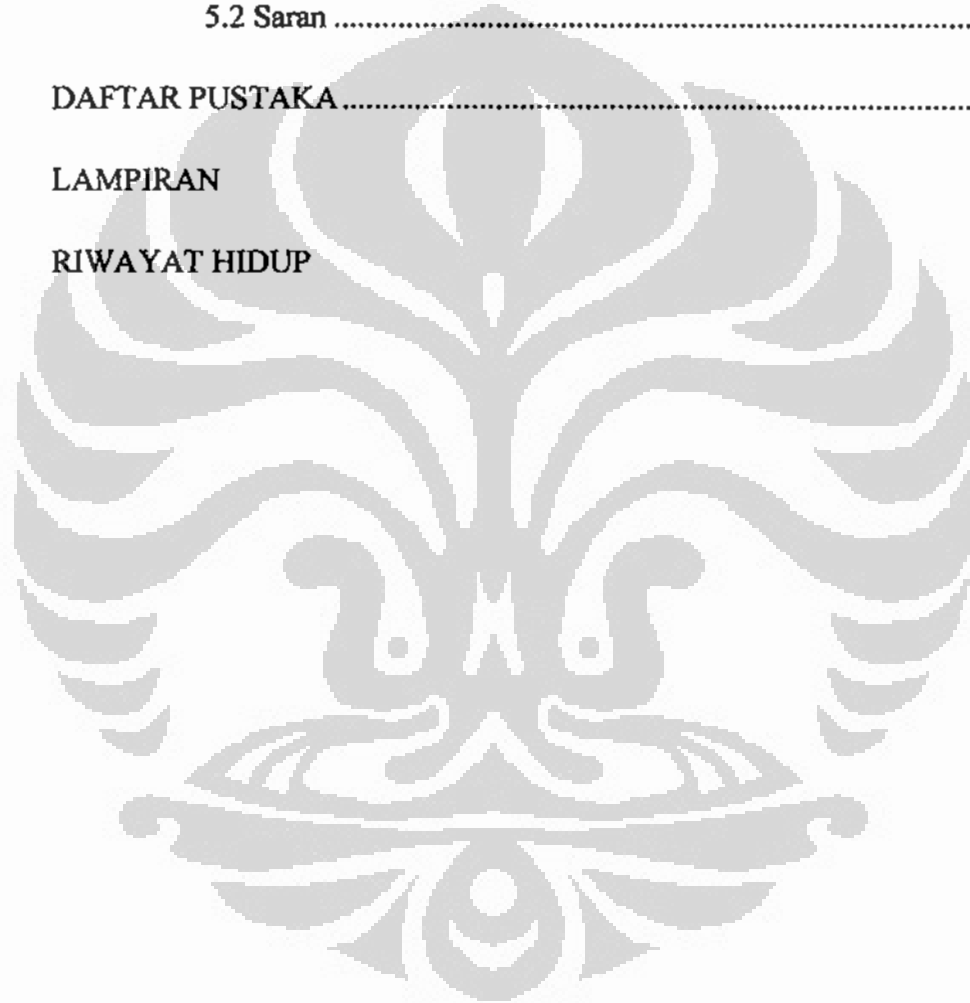
Keyword: Dengue Anti-NS1 antibody, Rabbit, Horseradish Peroxidase.

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS	ii
HALAMAN PENGESAHAN	iii
KATA PENGANTAR	iv
LEMBAR PENGESAHAN UNTUK PUBLIKASI KARYA ILMIAH	vi
ABSTRAK	vii
DAFTAR ISI	ix
DAFTAR GAMBAR	xii
DAFTAR TABEL	xiii
DAFTAR LAMPIRAN	xiv
DAFTAR SINGKATAN	xv
BAB I PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang Penelitian	1
1.2 Tujuan Penelitian	3
1.3 Manfaat Penelitian	4
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	5
2.1 Virus Dengue	5
2.1.1 Struktur fisik virus dengue	5
2.1.2 Struktur genom virus dengue	6
2.1.3 Protein struktural virus dengue	8
2.1.4 Protein non-struktural virus dengue	11
2.2 Diagnosis Infeksi Dengue	21
2.2.1 Isolasi Virus	22
2.2.2 Deteksi Antibodi	23

2.2.3	Deteksi Protein NS1	24
2.2.4	Deteksi Materi Genetik	25
2.3	Produksi Antibodi IgG pada Kelinci	25
2.4	Pelabelan Antibodi IgG dengan HRP	27
BAB III	BAHAN DAN CARA KERJA	29
3.1	Waktu dan Tempat Penelitian.....	29
3.2	Bahan	29
3.2.1	Antigen GST-NS1	29
3.2.2	Kelinci	29
3.2.3	HRP	30
3.3	Strategi Penelitian.....	30
3.4	Cara Kerja.....	30
3.4.1	Pemeriksaan Serum Kelinci Pre-Imunisasi dengan Dot Blot	30
3.4.2	Produksi Antibodi Anti-NS1 DENV-2 Dengue Pada Kelinci	31
3.4.3	Pemeriksaan Antibodi Anti-NS1 DENV-2 Serum Kelinci dengan Metode <i>indirect</i> ELISA	31
3.4.4	Purifikasi Antibodi IgG dari Serum Kelinci	32
3.4.5	Pelabelan Antibodi IgG Kelinci dengan HRP.....	33
3.4.6	Dot Blot Hasil Pelabelan Antibodi Anti-NS1 DENV-2	34
3.4.7	<i>Indirect</i> ELISA Hasil Pelabelan Antibodi Anti-NS1 DENV-2	35
3.4.8	<i>Indirect</i> ELISA Serum Kelinci SIIK03	35
BAB IV	HASIL DAN PEMBAHASAN	36
4.1	Hasil.....	36
4.1.1	Antibodi IgG Anti-NS1 Dengue pada Serum Kelinci ..	36
4.1.2	Purifikasi Antibodi IgG Serum Kelinci.....	38
4.1.3	Dot Blot Hasil Pelabelan Antibodi Anti-NS1 DENV-2 ..	39

4.1.4 <i>Direct</i> ELISA Hasil Pelabelan Antibodi Anti-NS1	
DENV-2	40
4.1.5 <i>Indirect</i> ELISA Serum Kelinci SIIK03	41
4.2 Pembahasan	43
BAB V KESIMPULAN DAN SARAN	48
5.1 Kesimpulan	48
5.2 Saran	48
DAFTAR PUSTAKA	49
LAMPIRAN	
RIWAYAT HIDUP	

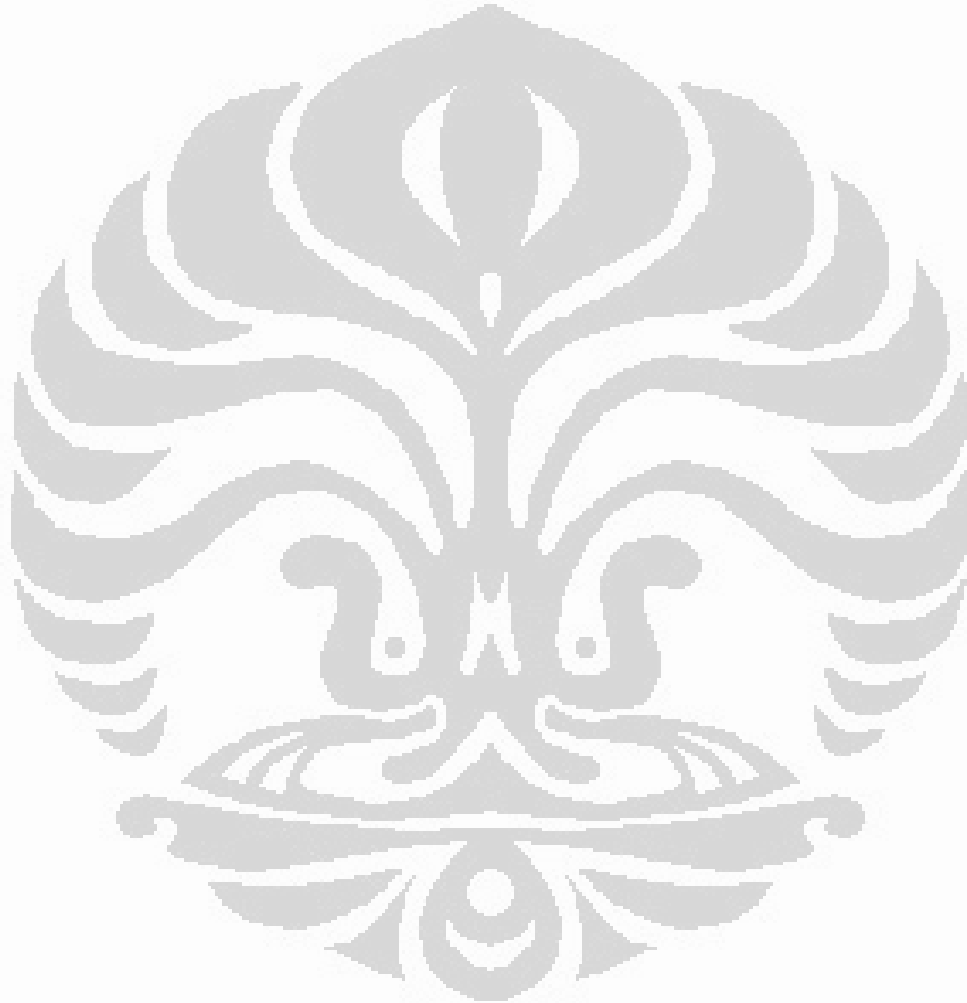


DAFTAR GAMBAR

Gambar 1.	Struktur Virus Dengue	6
Gambar 2.	Genom virus dengue dan pemrosesan poliproteinnya.	8
Gambar 3.	Struktur protein C.....	9
Gambar 4.	Struktur dimer dari fragmen larut E dengue (sE) pada partikel virus matur.	10
Gambar 5.	Struktur Helikase	18
Gambar 6.	N-terminal metil transferase (MTase) dan C-terminal RNA dependent-RNA polymerase domain (POL) dipisahkan oleh daerah interdomain (residu 320 sampai 405) terdiri dari bNLS dan a/bNLS dengan uraian urutan asam amino.....	20
Gambar 7.	Struktur pita RdRp DENV3.....	21
Gambar 8.	Perjalanan penyakit dengue dan waktu diagnosis	22
Gambar 9.	Respon antibodi dan sel T terhadap protein virus dengue	26
Gambar 10.	Konjugasi Horseradish Peroxidase (HRP) dengan antibodi (IgG) menggunakan metode periodat.	28
Gambar 11.	Pemeriksaan antibodi anti-NS1 pada hasil purifikasi serum kelinci dengan Sephadex G-200 menggunakan metode <i>indirect</i> ELISA.....	39
Gambar 12.	Pemeriksaan kemampuan deteksi SIK03HRP terhadap protein NS1 menggunakan metode <i>direct</i> ELISA	41
Gambar 13.	Pemeriksaan antibodi anti-NS1 SIK03 menggunakan metode <i>indirect</i> ELISA.....	42
Gambar 14.	Hasil uji western blot protein GST-NS1 dengan antibodi monoklonal anti-GST.....	43
Gambar 15.	Hasil SDS PAGE Protein NS1 Rekombinan	46

DAFTAR TABEL

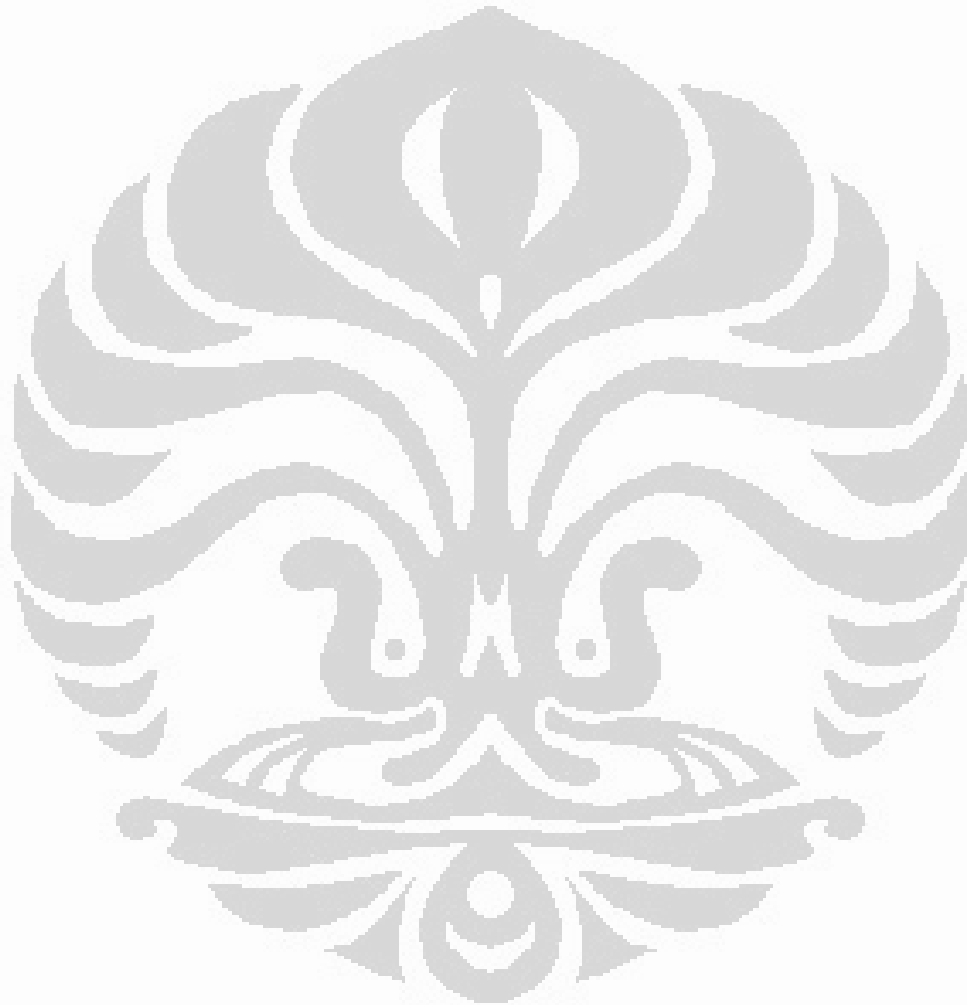
Tabel 1. Pemeriksaan Serum Kelinci K01, K02, K03, sebelum Imunisasi dengan Protein NS1 Menggunakan Metode Dot Blot	36
Tabel 2. Pemeriksaan Antibodi Anti-NS1 pada Serum Kelinci K01 dan K03 dengan <i>Indirect</i> ELISA	37
Tabel 4. Pemeriksaan SIIK03 HRP dengan Metode Dot Blot	40



DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. Runutan Nukleotida Gen NS1 DENV2 DS3106

Lampiran 2. Daftar Hasil Perbandingan Sekuens NS1 DS3106 Menggunakan *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST)



DAFTAR SINGKATAN

cDNA	:	complement deoxyribonucleic acid
CF	:	complement fixation
DAB	:	diaminobenzidin
DBD	:	demam berdarah dengue
DD	:	demam dengue
DDW	:	double distilled water
DENV	:	dengue virus
DSS	:	dengue shock syndrome
ELISA	:	enzyme linked immunosorbent assay
EM	:	electron microscope
FCA	:	freund's complete adjuvant
FIA	:	freund's incomplete adjuvant
GST	:	glutathione s-transferase
HI	:	hemagglutination inhibition
HRP	:	horseradish peroxidase
IFN	:	interferon
IgG	:	immunoglobulin G
IgM	:	immunoglobulin M
IL	:	interleukin
kDa	:	kilodalton
MAC-ELISA	:	immunoglobulin M (IgM) capture enzyme linked immunosorbent assay
MOI	:	multiplicity of infection
MTase	:	metiltransferase
NLS	:	nuclear localization signal
NS	:	non-structural
NT	:	neutralization test
NTPase	:	nucleoside triphosphatase
ORF	:	open reading frame
PBS	:	phosphate buffer saline
RdRP	:	RNA dependent-RNA polymerase
RE	:	retikulum endoplasma
RNA	:	ribonucleic acid
RT-PCR	:	reverse transcriptase polymerase chain reaction
SDS-PAGE	:	sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis
TMB	:	tetrametilbenzen
UTR	:	untranslated region
WHO	:	world health organization
YFV	:	yellow fever virus

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang Penelitian

Insiden penyakit dengue semakin meningkat dalam beberapa dekade terakhir. Sekitar 2,5 milyar penduduk, atau dua perlima dari seluruh penduduk bumi berisiko terkena penyakit dengue. WHO memperkirakan terjadi 50 juta infeksi dengue di seluruh dunia setiap tahun. Sekitar 500.000 orang dengan demam berdarah dengue (DBD) membutuhkan perawatan di rumah sakit, sebagian besar adalah anak-anak. Sekitar 2,5% diantaranya mengalami kematian. Penyakit ini telah menjadi endemis di lebih dari 100 negara di Afrika, Amerika, Asia Tenggara, dan Pasifik Barat. Negara-negara di Asia Tenggara dan Pasifik barat adalah yang paling parah terkena.^{1,2}

Di Indonesia, DBD pertama kali dilaporkan di Jakarta dan Surabaya pada tahun 1968, 15 tahun setelah kasus pertama di Filipina. Selama wabah tersebut, ditemukan 58 kasus klinis dengan jumlah kematian 24 kasus. Tahun berikutnya kasus meningkat menjadi 167 dengan kematian 40 orang.³ Sejak saat itu, insiden demam berdarah terus meningkat dan daerah yang terkena semakin meluas.⁴ Pada tahun 2008 kasus demam berdarah dengue di Indonesia mencapai 137,469 kasus dengan angka kematian 1,187. Sedangkan pada tahun 2009, terjadi peningkatan jumlah kasus dan kematian yaitu berturut-turut 154,855 dan 1,384.⁵

Sampai saat ini, belum ditemukan vaksin dengue yang aman dan imunogenik terhadap semua serotipe virus dengue. Kendalanya adalah vaksin harus mampu mencetuskan respon imun yang bertahan lama terhadap keempat serotipe virus dengue secara simultan dan menghindari munculnya respon imun

yang tidak lengkap. Respon imun parsial dapat menyebabkan penyakit dengue yang berat.⁶

Demikian pula dengan pengobatan. Hingga saat ini belum ada terapi spesifik untuk infeksi dengue. Pengobatan hanya bersifat simptomatik. Walaupun demikian, pada kasus DBD dan DSS, perawatan dini dapat menurunkan angka morbiditas dan mortalitas.^{7,8}

Infeksi virus dengue pada manusia mempunyai spektrum gejala yang luas, dari tanpa gejala (asintomatik), demam dengue (DD), demam berdarah dengue (DBD) hingga dengue *shock syndrome* (DSS). Di daerah endemis, gejala klinik sering tidak spesifik dan menyulitkan klinisi untuk membedakannya dengan penyakit demam lain.⁹

Karena gejala klinik yang tidak spesifik dan pentingnya perawatan segera, maka dibutuhkan uji laboratorium yang akurat untuk membantu menegakkan diagnosis dini infeksi dengue. Dari beberapa uji laboratorium yang tersedia, misalnya uji yang mendeteksi virus dengue, materi genetik virus, protein non-struktural 1 (NS1) virus, dan antibodi terhadap virus, maka tiga yang pertama cocok digunakan untuk deteksi dini.¹⁰ Teknik isolasi virus dan deteksi materi genetik virus sangat berhubungan dengan fase viremia, yang terjadi pada awal infeksi, sampai hari ke-4 demam. Begitu pula dengan deteksi NS1. Kadar NS1 dapat dideteksi hingga hari ke-9 sejak mulai demam.¹¹ Lain halnya dengan deteksi antibodi terhadap virus. Antibodi IgM baru dapat dideteksi pada hari ke-3 sampai ke-5 sejak demam dan IgG pada hari ke-10 sampai 14.¹²

Setiap jenis uji laboratorium mempunyai kekurangan dan kelebihan. Isolasi virus, baru dapat diperoleh hasilnya setelah enam sampai sepuluh hari.¹¹

Deteksi materi genetik, misalnya melalui pemeriksaan *reverse transcriptase polymerase chain reaction* (RT-PCR) dapat memberikan hasil segera, tetapi membutuhkan peralatan yang mahal dan teknisi yang terlatih.¹³ Berbeda dengan deteksi protein NS1 virus. Pemeriksaan ini dapat memberikan hasil lebih dini, akurat, dan dengan cara yang lebih murah.¹⁴ Cara untuk deteksi NS1 antara lain adalah dengan *enzyme linked immunosorbent assay* (ELISA) dan imunokromatografi. Kedua jenis uji ini telah tersedia secara komersial.

Walaupun telah tersedia kit komersial untuk deteksi protein NS1 dengue, masih perlu dikembangkan teknik deteksi NS1 *in house* untuk kepentingan penelitian lebih lanjut. Selain itu, antibodi anti-NS1 label HRP yang diperoleh dari penelitian ini selain dapat digunakan untuk pemeriksaan ELISA, seperti halnya kit komersial, juga dapat digunakan untuk pemeriksaan dot blot. Keuntungan lain adalah deteksi NS1 *in house* relatif lebih murah.

Pada penelitian ini dilakukan produksi antibodi anti-NS1 kelinci menggunakan protein GST-NS1 hasil ekspresi gen NS1 yang diperoleh dari DENV-2 strain DS-3106 (dari pasien DBD di Jakarta tahun 2006) koleksi Departemen Mikrobiologi FKUI. Selanjutnya, antibodi anti-NS1 tersebut dilabel dengan HRP.

1.2 Tujuan Penelitian

1.2.1 Tujuan Umum

Memproduksi antibodi anti-NS1 dengue berlabel-HRP.

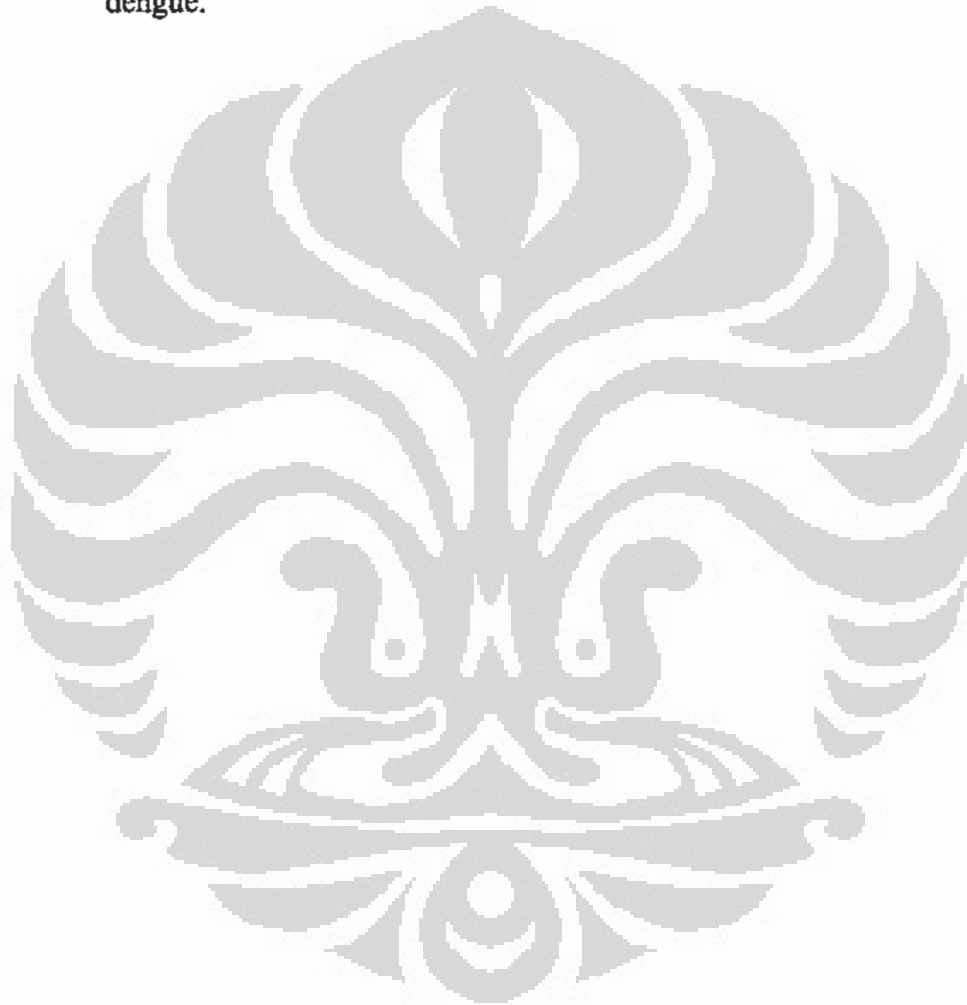
1.2.2 Tujuan Khusus

1. Memproduksi antibodi anti-NS1 kelinci dengan penyuntikan protein GST-NS1 rekombinan.

2. Melakukan pelabelan antibodi anti-NS1 dengan HRP.
3. Menguji antibodi anti-NS1 HRP dengan metode dot blot dan ELISA.

1.3 Manfaat Penelitian

Antibodi anti-NS1 label HRP yang dihasilkan dari penelitian ini diharapkan dapat menjadi kandidat reagen untuk uji diagnostik dini pasien terinfeksi dengue.



BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Virus Dengue

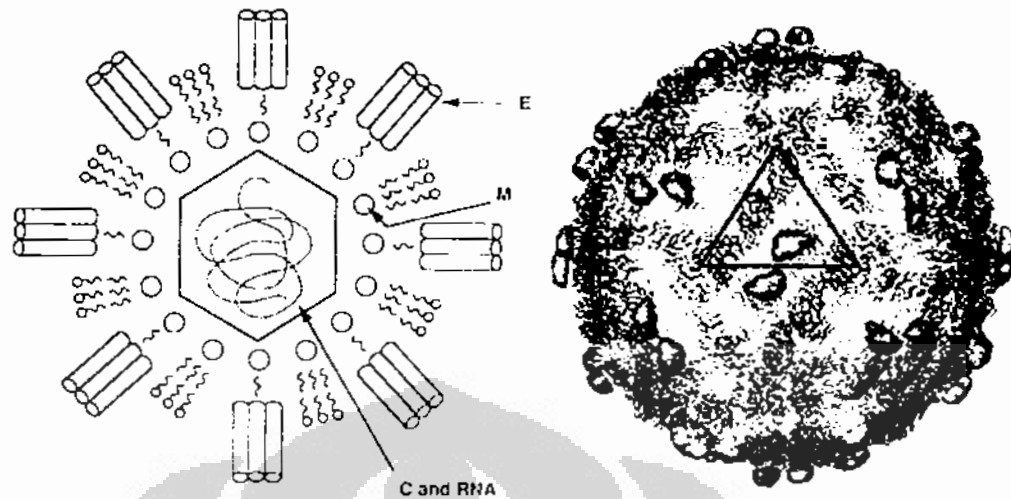
Virus dengue adalah anggota dari genus *Flavivirus*, bagian dari famili Flaviviridae. Virus dengue memiliki 4 serotipe yaitu, DENV-1, DENV-2, DENV-3 dan DENV-4. Keempat serotipe ini mempunyai perbedaan asam amino pada protein selubung (*envelope*) sekitar 25 sampai 40 persen.^{15,16}

Di Indonesia, pada epidemi tahun 2004, ditemukan semua serotipe. Paling banyak adalah DENV-3, disusul DENV-4, DENV-2, dan DENV-1.¹⁷

2.1.1 Struktur fisik virus dengue

Virus dengue lengkap memiliki diameter sekitar 50 nm.¹⁸ Bagian permukaan virus matur terdiri dari dua macam protein yaitu protein E (selubung) dan protein M (membran). Glikoprotein E, suatu determinan antigen utama, memediasi ikatan dan penggabungan pada proses masuknya virus ke dalam sel inang. Protein M, yang dihasilkan saat maturasi partikel virus baru dalam jalur pengeluaran, merupakan fragmen proteolitik berukuran kecil hasil dari penguraian protein prekursor prM.¹⁹

Genom virus dengue merupakan RNA untai tunggal positif *strand* berukuran 10,7 kb. Genome ini diselubungi oleh nukleokapsid ikosahedral atau isometrik (protein C) yang berdiameter sekitar 30 nm.^{20,21}



Gambar 1. Struktur Virus Dengue, (A) Gambaran skematik virus dengue matur. E, selubung; M, protein terikat membran; C, protein inti.²⁰ (B) Gambaran cryo-EM virus dengue.²²

2.1.2 Struktur genom virus dengue

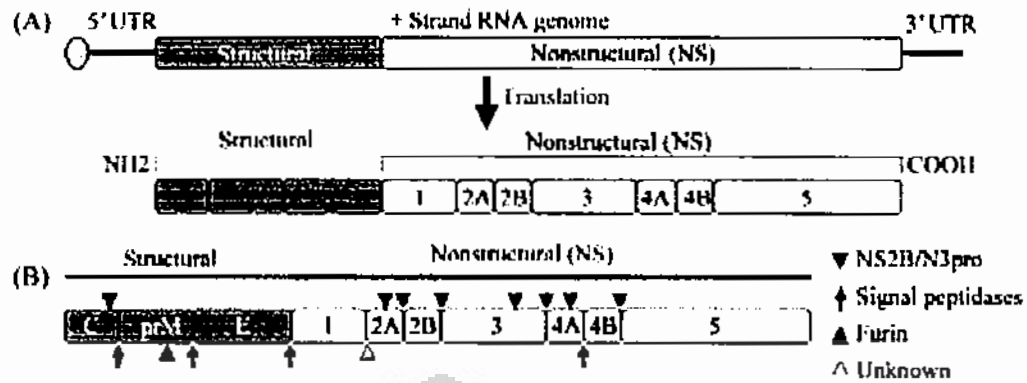
Virion dengue mengandung genom RNA untai tunggal positif *strand*, dimana ujung 5' merupakan *cap* tipe 1 ($7^mE G^5 - ppp^5 - N^{Mc}$) dan ujung 3' tidak memiliki ekor poliadenilat.¹⁸ Genom dengue hanya mempunyai satu *open reading frame* (ORF) sehingga hanya menghasilkan satu buah prekursor glikoprotein. Genom juga diapit oleh untai yang tidak mengkode protein (UTR; *untranslated region*).^{19,23,24}

Genom dekat ujung 5' mengkode tiga protein struktural, yaitu protein kapsid (C), protein prekursor membran (prM), dan protein selubung (E). Tujuh buah protein non struktural (NS) yang penting pada proses replikasi virus dikode oleh genom sisanya.^{21,25} Urutan protein yang dikode oleh genom dengue adalah 5'-C-prM-E-NS1-NS2A-NS2B-NS3-NS4A-NS4B-NS5-3'.¹⁸ Sedangkan total jumlah asam amino hasil translasi adalah sebanyak 3391.²⁶

Sesaat setelah virus dengue masuk ke dalam sel, genom virus akan dilepaskan ke dalam sitoplasma dan berperan sebagai cetakan untuk proses translasi menjadi prekursor poliprotein. Proses kontranslasi dan pascatranslasi oleh protease sel inang dalam retikulum endoplasma dan protease virus di sitoplasma akan memotong prekursor poliprotein menjadi 10 bagian.^{18,19} Protease sel inang memotong pada daerah antara C/prM, prM/E, E/NS1, dan NS4A/NS4B. Sedangkan protease NS2B/NS3 yang dimiliki virus akan memotong poliprotein pada daerah NS2A/NS2B, NS2B/NS3, NS3/NS4A, dan NS4B/NS5. Selain itu, protease NS2B/NS3 juga akan memotong bagian dalam protein C, NS2A, NS4A, dan NS3. Untuk daerah NS1/NS2A, enzim yang memotongnya masih belum diketahui. Enzim lain yang bekerja dalam proses pascatranslasi adalah protease furin sel inang. Enzim ini akan memotong protein prekursor membran (prM) menjadi protein membran (M) pada virion matur.^{18,19}

Pada daerah UTR 5', ribosom berikatan dengan 5' terminus untai positif untuk memulai translasi, dan replikasi berikatan dengan 3' terminus untai negatif untuk memulai transkripsi menjadi untai positif. Mutasi yang mengubah UTR 5' sehingga mengganggu interaksi RNA-protein telah terbukti mempengaruhi virulensi dan menyebabkan pelemahan virus.²¹

Ujung UTR 3' yang mengandung sekuens yang penting untuk replikasi dan pertumbuhan virus, berfungsi sebagai sinyal untuk inisiasi sintesis untai negatif. Delesi yang dilakukan sehingga diperoleh DENV-4 cDNA dengan panjang penuh yang tidak mengikutsertakan 3' terminal sebanyak 113 nt, menghasilkan virus yang dapat hidup jika ditransfeksikan ke dalam sel biakan, tetapi menunjukkan keterbatasan pertumbuhan.²¹



Gambar 2. Genom virus dengue dan pemrosesan poliproteinnya. (A) Genom virus dengue mempunyai satu open reading frame (ORF), yang ditranslasi menjadi satu prekursor poliprotein virus. Domain struktural berwarna hijau dan domain non struktural berwarna hijau muda. Ujung 5' mempunyai *cap* tipe 1, berwarna jingga, dan ujung 3' tidak memiliki ekor poly(A). (B) Pemrosesan proteolitik pada poliprotein virus dengue. Poliprotein virus dengue dipotong oleh protease virus dan inang sehingga terbentuk tiga protein struktural (C, kapsid atau protein inti; E, protein selubung; pM, protein prekursor membran), berwarna hijau, dan tujuh protein non struktural (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, NS5), berwarna biru muda. UTR, daerah yang tidak ditranslasi.¹⁸

2.1.3 Protein struktural virus dengue

Protein C

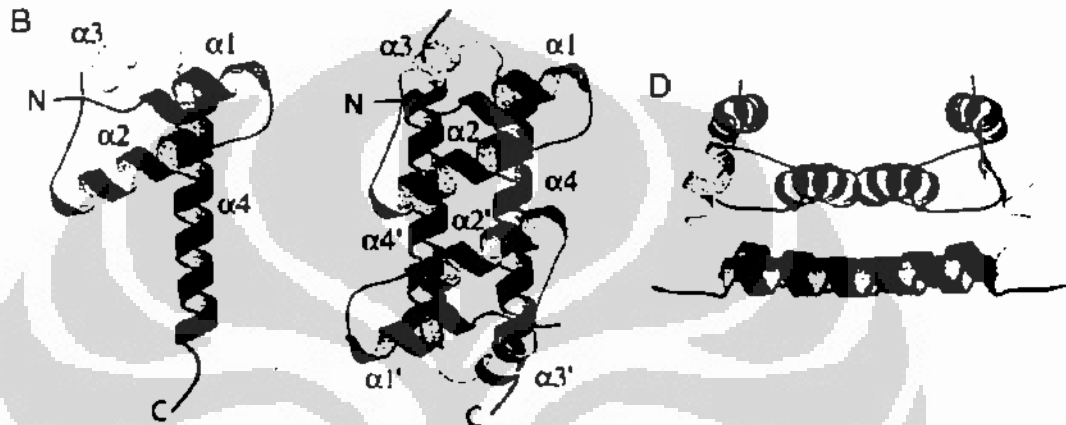
Protein C merupakan polipeptida virus yang disintesis pertama kali saat proses translasi. Protein ini mempunyai berat molekul sekitar 13,5 kD, dan kaya akan lisin dan arginin. Sifat ini tampaknya menyebabkan protein C dapat berinteraksi dengan virion RNA.²⁰

Setiap monomer protein C terdiri dari empat struktur heliks α , yaitu α_1 , α_2 , α_3 , dan α_4 . Pembentukan dimer protein C terjadi karena adanya interaksi hidrofobik yang ekstensif antara heliks α_2 - α_2' dan α_4 - α_4' .^{19,27}

Daerah dengan densitas tinggi arus positif terdapat pada daerah α_4 - α_4' , sedangkan bagian konkaf dari interaksi α_2 - α_2' adalah apolar dan bersifat hidrofobik. Daerah α_4 - α_4' yang bermuatan positif akan berinteraksi dengan RNA

sedangkan daerah α_2 - α_2' yang hidrofobik akan berinteraksi dengan membran virus.²⁷

Protein C sangat penting pada perakitan virus, yaitu untuk menyelubungi genom virus.²⁷



Gambar 3. Struktur protein C. Heliks α_1 biru, α_2 hijau, α_3 kuning, dan α_4 magenta. Monomer protein C (kiri), bentuk dimer (tengah), dan dimer dengan rotasi 90° terhadap garis vertikal.²⁷

Glikoprotein Membran prM

Prekursor prM (22 kD) selama proses maturasi virus akan mengalami pemotongan.²⁰ Konversi partikel virus immatur menjadi virion matur terjadi pada jalur sekresi dan bertepatan dengan pemotongan prM menjadi bagian pr dan M (8 kD) oleh protease furin yang ada dalam badan Golgi. Setelah pemotongan, prM-E heterodimer akan terurai, bagian pr akan dilepaskan dan homodimer E akan terbentuk.¹⁹

Fungsi utama prM adalah untuk mencegah protein E mengalami penyusunan ulang yang dikatalisis suasana asam menjadi bentuk fusogenik selama transit melalui jalur sekresi.¹⁹

Protein E

Glikoprotein E, merupakan glikoprotein virion yang mempunyai besar 51-60 kD, tampak sebagai homotrimer pada permukaan virion.²⁰



Gambar 4. Struktur dimer dari fragmen larut E dengue (sE) pada partikel virus matur. (a) Tiga domain sE dengue. Domain I berwarna merah, domain II berwarna kuning, dan domain III berwarna biru. (b) Dimer sE. Konformasi E pada partikel virus matur dan pada larutan di atas pH fusi. (c) Pengemasan E pada permukaan virus. Gambaran mikroskop elektron memperlihatkan 90 dimer E dengan pola ikosahedral.²⁸

Setiap subunit protein E terdiri dari tiga domain, yang lipatnya sebagian besar adalah lembar β^7 : I, yang membentuk suatu *barrel*; II, yang menonjol pada permukaan virus antara daerah transmembran subunit homodimer; dan III, yang memelihara lipatan seperti immunoglobulin. Suatu peptida yang diduga memediasi insersi ke membran sel target, berlokasi pada ujung domain II, di distal daerah transmembran. Domain III tampaknya terlibat dalam ikatan dengan reseptor dan merupakan target utama antibodi netralisasi.²¹

Glikoprotein E yang terdapat pada permukaan virion dengue, merupakan antigen virus dominan.²¹ Protein permukaan yang memediasi ikatan reseptor dan fusi membran.^{19,25}

2.1.4 Protein non-struktural virus dengue

Protein NS1

Protein NS1 adalah protein non struktural dengan berat molekul sekitar 46 kDa. Protein ini mengalami translokasi ke dalam retikulum endoplasma (RE) selama proses sintesis, dan dipotong dari protein E oleh peptidase inang. Sedangkan bagian NS1/NS2A dipotong oleh suatu enzim inang yang terdapat pada RE yang sampai saat ini belum diketahui.¹⁹

Protein NS1 dengue telah diidentifikasi sebagai protein intraseluler terikat-membran dan protein ekstraseluler terlarut.²⁹ Pada pasien dengue, kadar NS1 dalam serum bervariasi antar individu, dari beberapa nanogram per mililiter sampai beberapa mikrogram per mililiter, dan pada salah satu kasus mencapai 50 µg/ml serum. Nilai ini cukup besar untuk dapat dideteksi oleh pemeriksaan ELISA. Alcon dkk menemukan bahwa ELISA yang mereka kembangkan dapat mendeteksi hingga 1 ng/ml.¹³

Oligomerisasi merupakan sifat umum protein NS1. Pada sel terinfeksi secara *in vitro*, NS1 terdeteksi dalam kompartemen intraseluler, pada permukaan sel, dan disekresi dalam jumlah banyak dalam medium. Bentuk intraseluler adalah dimerik, sementara bentuk yang disekresikan adalah dimerik, pentamerik, dan heksamerik. Pada permukaan sel terinfeksi, monomer tertanam pada membran plasma melalui ikatan *glycosyl-phosphatidylinositol*. Bentuk sekresi multimerik awalnya dinamakan sebagai *soluble complement fixing antigen* dan dimanfaatkan untuk kepentingan diagnosis demam dengue.¹⁹

NS1 mengandung 12 residu sistein lestari yang membentuk jembatan disulfida. Enam jembatan disulfida merupakan determinan antigenesitas yang

penting dan berperan dalam menentukan sifat fungsional protein. Pola pasangan disulfida sudah diketahui.¹⁹

Sekitar 30 menit setelah sintesis, NS1 akan membentuk homodimer yang sangat stabil. Karena protein ini sangat hidrofilik dan kurang mengandung domain transmembran, sifat terikat membran dari protein ini masih belum jelas. Salah satu kemungkinan adalah, dimerisasi membentuk permukaan hidrofobik yang berguna untuk asosiasi dengan membran perifer.¹⁹

NS1 mempunyai peran penting yang belum diketahui dalam replikasi RNA. NS1 berada pada lokasi replikasi RNA dan mutasi pada *N-linked glycosylation sites* dari NS1 dapat menyebabkan defek hebat pada replikasi RNA dan pembentukan virus.¹⁹

Fungsi NS1 ekstraseluler belum diketahui. Selama infeksi, respon humoral kuat terjadi terhadap protein ini, dan antibodi terhadap NS1 permukaan sel dapat mencetuskan lisis sel terinfeksi melalui mediasi komplemen.¹⁹

NS1 mencetuskan respon imun humoral dan seluler baik pada manusia maupun pada hewan coba. Transfer pasif antibodi NS1 dapat memberikan perlindungan terhadap infeksi DENV pada hewan coba.¹⁹

NS1 telah dievaluasi sebagai kandidat vaksin dan dapat menginduksi respon imun protektif pada hewan coba terhadap infeksi virus dengue. Immunogenesitas NS1 tampaknya tergantung keadaan fisik NS1 dalam sediaan imunisasi. Bentuk dimer lebih baik dibandingkan dengan monomer, dan tingkat proteksi lebih tinggi pada NS1 terlarut dibandingkan dengan NS1 terikat membran.¹⁹

NS1 berperan penting pada patogenesis, karena epitopnya menyerupai molekul permukaan sel endotelial. Akibat kemiripan epitop, maka antibodi terhadap NS1 juga akan menginduksi kerusakan sel endotelial dan mencetuskan respon sitokin inflamasi yang menyebabkan perdarahan.¹⁹

Epitop spesifik serotipe, spesifik subkompleks, spesifik grup, dan reaksi silang dengan flavivirus lainnya telah diidentifikasi, dan peta epitop rinci dari NS1 DENV-2 sebagian telah diketahui.

Falconar dkk, dengan menggunakan 34 antibodi monoklonal mencit yang spesifik terhadap protein NS1 DENV-2, menemukan empat epitop. Epitop tersebut adalah 24C (asam amino 299-309) mengenali NS1 DENV-2/4, epitop LX1 (asam amino 111-121) mengenali keempat serotipe. Epitop lainnya adalah LD2 (asam amino 25-33) dan epitop 24A (asam amino 61-69). Dua epitop terakhir diperkirakan tergantung pada konformasi.³⁰

Chunya Puttikhunt dkk, melalui analisis monoklonal antibodi yang diperoleh dari imunisasi mencit dengan DNA plasmid yang mengkode NS1 transmembran DENV-2, mengidentifikasi enam epitop. Dua epitop spesifik dimiliki oleh dengue serotipe-2, dua epitop diidentifikasi dimiliki oleh keempat serotipe dengue, dan satu epitop diidentifikasi juga dimiliki oleh virus Japanese encephalitis. Dari kelima epitop tersebut, tiga berupa epitop linear dan dua berupa epitop konformasional.³¹

Lan Jiang dkk, dengan menggunakan analisis bioinformatika komprehensif terhadap epitop NS1 menyimpulkan bahwa epitop dominan kemungkinan berlokasi pada asam amino 36-45, 80-89, 103-112, 121-130, 187-196, 295-304, and 315-324.³²

Yu Chen, dkk memetakan epitop linear protein NS1 menggunakan 149 antibodi monoklonal. Mereka mengidentifikasi tiga epitop yang spesifik serotipe DENV-1, yaitu pada asam amino 1–15, 71–85, dan 338–352. Selain itu, mereka juga mengidentifikasi lima epitop yang spesifik grup yaitu residu asam amino 21–35, 111–125, 191–205, 261–275, dan 291–305. Di antara epitop-epitop tersebut, mereka menyimpulkan bahwa paling tidak ada lima epitop imunodominan, yaitu yang berlokasi di residu asam amino 1–15, 21–35, 111–125, 191–205, dan 261–275.³³

Manfaat protein NS1 untuk kepentingan diagnosis dengue telah dievaluasi oleh beberapa penelitian sebelumnya, baik menggunakan metode ELISA maupun immunokromatografi.

Sekarang dkk telah mengevaluasi uji PanBio Dengue NS1 Antigen Capture ELISA. Mereka menggunakan 206 sampel serum dan 8 isolat virus. Sampel tersebut dianalisis dengan TaqMan RT-PCR, ELISA IgM *in-house*, uji *haemagglutination inhibition* (HI), dan Panbio NS1 ELISA. Angka deteksi PanBio Dengue NS1 Antigen Capture ELISA tanpa ada IgM di dalam serum adalah 91,6%. Sedangkan jika ada IgM, hanya 48,3%. Sensitifitas keseluruhan PanBio Dengue NS1 Antigen Capture ELISA pada serum dengan kultur positif adalah 91,6%.³⁴

Tricou dkk telah menguji sensitifitas dan spesifitas uji cepat Bio-Rad NS1 Ag Strip dan SD Dengue Duo (NS1/IgM/IgG) *lateral flow*. Mereka menggunakan 245 sampel serum pasien yang telah dikonfirmasi dengan RT-PCR dan 47 sampel dari penyakit demam lain. Kedua uji cepat tersebut mempunyai sensitifitas yang hampir sama yaitu berturut-turut 61,6% dan 62,4% serta

spesifitas 100% untuk kasus dengue yang telah dikonfirmasi. Jika hasil dari IgM/IgG dari SD Dengue Duo diikuti dalam interpretasi uji, sensitifitas meningkat secara signifikan dari 62,4% menjadi 75,5% (NS1 dan/atau IgM positif) dan 83,7% (Ns1 dan/atau IgM dan/atau IgG positif). Kedua uji lebih sensitif pada infeksi dengue primer dibandingkan dengan infeksi sekunder.³⁵

Kumarasamy dkk telah menguji kit Platelia[™] Dengue NS1 Ag. Mereka menemukan bahwa kit uji tersebut memiliki sensitifitas sebesar 93,4% (199/213) dan spesifitas 100% (354/354). Sensitifitas lebih tinggi pada infeksi dengue primer (97,3%) daripada infeksi dengue sekunder (70%).³⁶

Chaiyaratana dkk mengevaluasi strip antigen NS1 dari Bio-Rad Laboratories (Marnes-la-Coquette, France) terhadap kit Platelia Dengue NS1 Ag. Mereka menggunakan 89 sampel serum pasien terinfeksi dengue dan 15 sampel serum pasien penderita demam lain. Mereka menyimpulkan bahwa sensitifitas strip antigen NS1 adalah 98,9% dan spesifitasnya adalah 90,6%.³⁷

Dussart dkk telah menguji tiga jenis uji NS1, yaitu Platelia Dengue NS1 Ag (Bio-Rad), Dengue NS1 Ag STRIP (Bio-Rad Laboratories-Marnes La Coquette, France), dan pan-E Dengue Early ELISA (Panbio-Brisbane, Australia). Platelia Dengue NS1 Ag mempunyai sensitifitas sebesar 87,4% (n=222); Dengue NS1 Ag STRIP sebesar 81,5% setelah 15 menit dan 82,4% setelah 30 menit. Kedua jenis uji ini memiliki spesifitas 100%. Sedangkan pan-E Dengue Early ELISA memiliki sensitifitas 60,4% dan spesifitas 97,9%.³⁸

Bessoff dkk mengevaluasi uji Platelia dengue NS1Ag (Bio-Rad Laboratories, Marnes La Coquette, France) dan Pan-E dengue early ELISA (Panbio Diagnostics, Brisbane, Australia), dengan 208 serum yang telah diperiksa

dengan real-time RT-PCR dan isolasi virus, dan 45 serum negatif dari pasien dengan demam akut lainnya. Sensitifitas uji Panbio adalah 64,9% dan Bio-Rad adalah 83,2%, dengan variasi antar serotipe, terutama untuk DENV-4.³⁹

Chuansumrit dkk mengevaluasi antigen NS1 untuk diagnosis dini pasien terinfeksi dengue selama fase demam. Sampel yang digunakan sebanyak 445 serum berasal dari 165 pasien terinfeksi dengue, dengan rincian demam dengue 42 pasien, demam berdarah dengue grade I 50 pasien, grade II 63 pasien, grade III dan IV 10 pasien; dan dari 8 pasien penyakit demam lainnya. Hasil positif, baik pada pasien demam dengue maupun demam berdarah dengue, sebesar 100% (7/7) pada hari II demam, 92,3% (12/13) pada hari III, 76,9% (40/52) pada hari IV, 56,5% (61/108) pada hari V, 43,1% (59/137) pada hari ke VI atau hari I bebas demam, dan 29,8% (25/84) pada hari VII atau satu hari setelah bebas demam. Mereka menyimpulkan bahwa uji antigen NS1 dengue merupakan perangkat yang berguna untuk menegakkan diagnosis dini infeksi dengue setelah timbulnya demam.⁴⁰

Ludert dkk telah menggunakan *enzyme immunoassay* Platelia™ Dengue NS1 AG (Bio-Rad Laboratories) untuk memonitor replikasi virus pada biakan sel sel secara semikuantitatif. Mereka menemukan bahwa jumlah NS1 yang dideteksi pada supernatan sel terinfeksi proporsional dengan MOI (*multiplicity of infection*) awal yang digunakan dan waktu antara awal infeksi dan panen. Mereka menyimpulkan bahwa Platelia™ Dengue NS1 AG dapat digunakan sebagai metode yang cepat dan dapat diandalkan untuk melakukan perhitungan relatif replikasi virus dengue pada biakan sel.⁴¹

Protein NS2A dan NS2B

NS2A merupakan protein hidrofobik yang relatif kecil (sekitar 22 kD). Ujung N-nya merupakan hasil pemotongan NS1/NS2A oleh enzim inang yang terdapat pada ER. Bagian NS2A/NS2B dipotong oleh protease serine NS2B-NS3. Selain itu, protease serine ini juga akan memotong bagian dalam NS2A.¹⁹

NS2A terlibat dalam replikasi dan perakitan virus. Selain itu, NS2A juga bekerja sebagai antagonis interferon (IFN) dengan menghambat signaling IFN.¹⁹

NS2B merupakan protein terikat membran, juga berukuran kecil (14 kD). NS2B membentuk kompleks yang stabil dengan NS3 dan bekerja sebagai kofaktor untuk protease serine NS2B-NS3.¹⁹

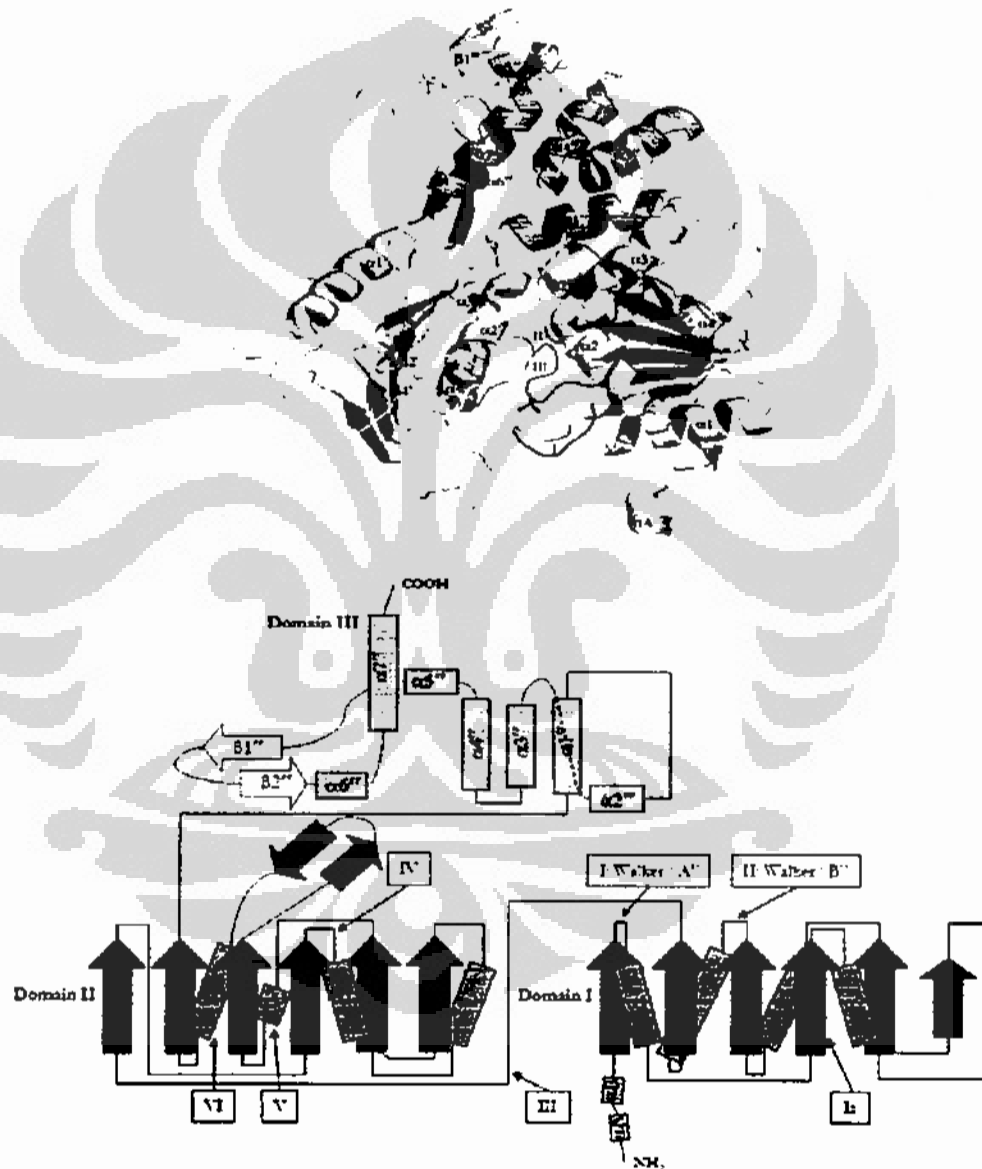
Protein NS3

Protein NS3 merupakan protein fungsional berukuran 618 asam amino (70 kD) yang memiliki aktifitas protease, helikase, nukleosida 5'-fosfatase (NTPase), juga 5'-terminal RNA trifosfatase, memainkan peran penting pada pemrosesan poliprotein dan replikasi genom.⁴²

Sebanyak 180 asam amino N-terminal NS3 merupakan domain protease serine, bersama protein NS2B yang bertindak sebagai kofaktor terikat membran, dibutuhkan untuk aktifitas proteolitik.⁴² Kompleks protease serine NS2B-NS3 ini selain bekerja untuk memotong bagian NS2A/NS2B, NS2B/NS3, NS3/NS4A, dan NS4B/NS5, juga memotong bagian dalam NS2A dan NS3.¹⁹

Domain C-terminal protein ini terlibat pada replikasi RNA virus. Daerah dari asam amino 180 sampai 618 terdiri dari dua motif yang dinamakan Walker A, GK (S/T), dan Walker B, DEx (D/H). Motif tersebut mengkode sejumlah besar protein yang mempunyai berbagai macam fungsi.⁴² Daerah C-terminal NS3

mengkode daerah yang homolog secara signifikan dengan RNA helikase. Aktifitas RNA-stimulated nucleoside triphosphatase (NTPase) dan aktifitas RNA *unwinding*, telah diketahui pada protein NS3 flavivirus dan mutagenesis pada daerah aktif helikase telah membuktikan peran penting enzim ini pada replikasi virus.¹⁹



Gambar 5. Struktur Helikase, (A) Helikase NS3:171-618 virus Dengue. (B) Diagram helikase NS3:171-618 virus Dengue.⁴²

Struktur sinar X domain helikase NTPase dari NS3 DENV dan yellow fever virus (YFV) telah ditemukan. Struktur helikase terdiri dari tiga subdomain, dua domain terlibat dalam hidrolisis nukleosida trifosfat, dan satu domain unik C-terminal yang mungkin terlibat pada RNA spesifik-virus dan aktifitas pengenalan protein.¹⁹

Domain I (residu 181 sampai 326) dan domain II (residu 327 sampai 481) menunjukkan sekuens yang sedikit berbeda, tetapi secara struktural mirip, terdiri dari enam untai lembar β dan empat heliks α . Domain III (residu 482 sampai 618) didominasi oleh heliks α terdiri dari empat heliks α paralel (α_1 , α_3 , α_4 , dan α_7), dikelilingi oleh tiga heliks α yang lebih pendek (α_2 , α_5 , dan α_6), dan dua buah lembar β antiparalel.⁴²

NS3 flavivirus juga mengkode aktifitas RNA trifosfatase (RTPase) yang diperkirakan mendefosforilase ujung 5' genom RNA sebelum penambahan cap.¹⁹

Flavivirus seringkali bersifat sitopatik pada sel mamalia, membunuh melalui mekanisme apoptosis. Protein NS3 dari Langat, DENV-2, dan WNV telah terbukti menginduksi apoptosis, pada beberapa kasus melalui aktivasi caspase-8.¹⁹

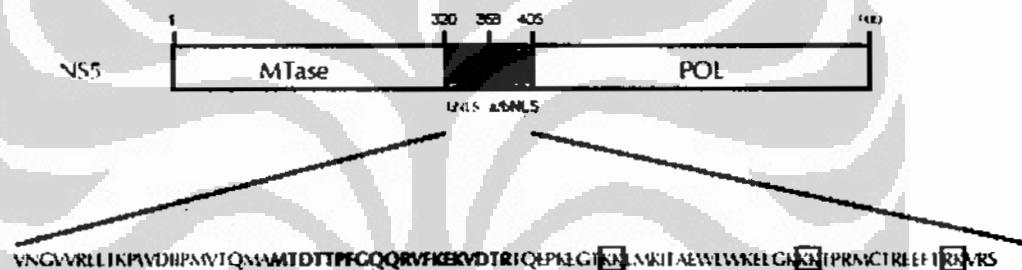
Protein NS4A dan NS4B

NS4A dan NS4B merupakan protein hidrofobik berukuran kecil (berturut-turut 16 kD dan 27 kD). Peran NS4A pada replikasi RNA ditunjukkan oleh keberadaan protein ini bersama dengan kompleks replikasi. NS4B berada bersama dengan NS3 dan dsDNA virus pada struktur membran yang berasal dari ER, yang diperkirakan sebagai tempat replikasi RNA. NS4B juga mengalami modifikasi pascatranslasi menjadi sebuah bentuk yang bermigrasi lebih cepat pada sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE), tetapi identitas

dan fungsi modifikasi ini masih belum diketahui. Seperti halnya protein NS2A, NS4A dan NS4B juga dapat menghambat signaling IFN tipe I.¹⁹ Selain itu, NS4A dan NS4B terlibat dalam lokalisasi membran dari kompleks replikasi NS3 dan NS5.²¹

Protein NS5

NS5 merupakan protein multifungsi berukuran besar (103 kD, 900 residu asam amino) dan sangat lestari (*conserve*). Protein ini mempunyai aktifitas metiltransferase (MTase) dan RNA dependent-RNA polymerase (RdRP).^{19,23}



Gambar 6. N-terminal metil transferase (MTase) dan C-terminal RNA dependent-RNA polymerase domain (POL) dipisahkan oleh daerah interdomain (residu 320 sampai 405) terdiri dari bNLS dan a/bNLS dengan uraian urutan asam amino.²³

Pada Gambar 6 ditunjukkan sekuens asam amino NS5. Pada N-terminal terdapat protein yang berfungsi sebagai MTase, sedangkan pada C-terminal adalah protein RdRP (POL). Kedua protein ini mengapit suatu daerah interdomain yang merupakan rangkaian asam amino yang berfungsi sebagai *nuclear localization signal* (NLS). Fungsi NLS adalah untuk membantu transpor aktif bentuk hiperfosforilasi NS5 yang berukuran besar ke dalam nukleus. a/b NLS (residu asam amino 368-405) adalah NLS yang berinteraksi dengan heterodimer α/β importin. Sedangkan bNLS adalah NLS (320-368) yang berinteraksi dengan kuat dengan β importin.²³

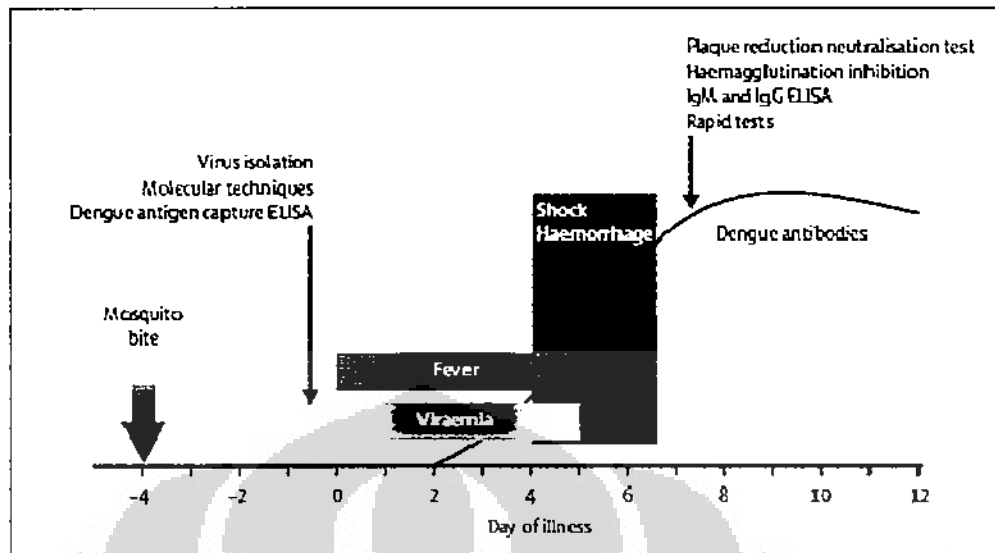


Gambar 7. Struktur pita RdRp DENV3. Biru : fingers, Kuning: NLS, Hijau : palm; Merah: Thumb.⁴³

C-terminus dari NS5 homolog dengan RdRP dari virus RNA positive-strand lainnya. Aktifitas polimerase dari protein ini telah dibuktikan melalui NS5 rekombinan. NS5 membentuk kompleks dengan NS3 dan dapat menstimulasi baik aktifitas NTPase dan RTPase dari NS3. Peran NS5 selain pada replikasi RNA adalah menginduksi transkripsi dan sekresi IL-8, sehingga meningkatkan penyebaran virus melalui perekrutan sel inflamasi ke lokasi infeksi.¹⁹

2.2 Diagnosis Infeksi Dengue

Diagnosis infeksi dengue secara umum dilakukan pada dua periode yaitu periode demam dimana terjadi viremia dan ditemukannya protein NS1 di dalam darah; dan tahap periode pasca demam sampai beberapa minggu kemudian dimana terjadi produksi antibodi IgM dan IgG (Gambar 8).¹⁴



Gambar 8. Perjalanan penyakit dengue dan waktu diagnosis¹⁴

2.2.1 Isolasi Virus

Isolasi virus banyak digunakan sebagai standar emas penegakan diagnosis dengue.⁴⁴ Teknik ini dapat mendeteksi keberadaan virus mulai hari pertama demam sampai hari ketiga.^{11,45} Sayangnya, hasil isolasi virus baru diketahui 6 sampai 10 hari, terlalu lama ditinjau dari kepentingan perawatan klinik.¹¹

Virus dengue dapat diisolasi dari serum plasma atau leukosit pada fase demam. Selain itu, juga dapat diisolasi dari spesimen postmortem seperti hati, paru-paru, limpa, kelenjar limfe, timus, cairan serobrospinal, dan cairan pleura.⁶

Isolasi virus menggunakan beberapa teknik, antara lain inokulasi intraserebral pada mencit baru lahir, inokulasi pada biakan sel mamalia, inokulasi intratorakal nyamuk dewasa, dan inokulasi pada biakan sel nyamuk.⁴⁴

Inokulasi intraserebral pada mencit baru lahir memiliki beberapa kekurangan, yaitu sensitifitas lebih rendah, isolasi membutuhkan waktu yang lama, dan biayanya lebih mahal. Biakan sel mamalia juga memiliki kekurangan

seperti halnya pada inokulasi intraserebral. Oleh karena itu, cara ini tidak dianjurkan untuk digunakan sebagai alat diagnostik rutin infeksi dengue.⁴⁴

Inokulasi virus pada nyamuk adalah yang paling sensitif, tetapi cara ini jarang dilakukan. Ada empat spesies nyamuk yang sering digunakan untuk inokulasi virus dengue yaitu *Aedes aegypti*, *A. albopictus*, *Toxorhynchites amboinensis* dan *T. splendens*.⁴⁴

Biakan pada sel nyamuk merupakan metode isolasi virus terbaru. Sel yang paling banyak digunakan adalah klon c6/36 dari sel *A. albopictus*. Penggunaan sel tersebut menjadi metode yang cepat, cukup sensitif, dan relatif murah. Walaupun teknik ini kurang sensitif dibandingkan dengan inokulasi intratorakal, tetapi karena kemampuannya untuk memeriksa beberapa sampel secara bersamaan, maka biakan pada sel nyamuk menjadi teknik standar isolasi virus dengue.⁴⁴

2.2.2 Deteksi Antibodi

Deteksi antibodi terhadap dengue menggunakan beberapa cara, yaitu *hemagglutination inhibition* (HI), *complement fixation* (CF), *neutralization test* (NT), *immunoglobulin M* (IgM) *capture enzyme linked immunosorbent assay* (MAC-ELISA) dan *indirect immunoglobulin G ELISA*.⁴⁴

Keterbatasan dari teknik deteksi antibodi adalah adanya reaksi silang baik antar serotipe dengue maupun dengan flavivirus lainnya (*yellow fever virus*, *Japanese encephalitis virus*, atau *St. Louis encephalitis virus*).⁴⁴

Selain itu, antibodi terhadap dengue baru dapat dideteksi sekitar hari kelima pasca demam sehingga tidak cocok untuk digunakan sebagai alat diagnostik dini.⁴⁴

2.2.3 Deteksi Protein NS1

NS1 dengue merupakan glikoprotein yang ditemukan pada pasien dengue akut. Protein ini sangat lestari (*conserved*) pada semua serotipe dengue, dan ditemukan dalam kadar yang tinggi pada periode awal penyakit. Kadar protein NS1 berkorelasi dengan viremia dan kemungkinan berkembangnya demam berdarah dengue.³⁶

Protein NS1 ditemukan pada 82% pasien dengan infeksi dengue, dari hari ke-1 sampai hari ke-9 sejak mulai demam, baik pada infeksi primer maupun sekunder dan sebelum IgM dapat terdeteksi.³⁶

Kumarasamy dkk menemukan bahwa dengue NS1 *antigen-capture* ELISA komersial mempunyai kemampuan deteksi lebih baik dibandingkan dengan isolasi virus dan RT-PCR untuk sampel serum tunggal.³⁶

McBride membandingkan dua pemeriksaan ELISA komersial. Hasilnya adalah sensitifitas uji Bio-Rad Platelia™ (Bio-Rad Laboratories, Marnes-La-Coquette, France) NS1 dengue sebesar 73.6%. Sedangkan uji Panbio Early ELISA (Panbio Diagnostics, Brisbane, Australia) mempunyai sensitifitas sebesar 63.7%. Sensitifitas kedua uji ini paling tinggi pada hari kedua sampai keempat perjalanan penyakit dan pada infeksi primer.⁴⁶

Selain ELISA, antigen NS1 juga dapat dideteksi dengan uji immunokromatografi antigen NS1 dengue. Pemeriksaan ini lebih cepat, mudah dilakukan, sensitif, dan spesifik untuk mendeteksi infeksi dengue secara dini. Sensitifitas dan spesifitasnya jika dibandingkan dengan ELISA adalah berturut-turut 98,9% dan 90,6% (Bio-Rad Laboratories, France).³⁷

Karena mudah dilakukan dan cepat memberikan hasil, uji immunokromatografi NS1 cocok digunakan sebagai uji lini pertama di lapangan.³⁸ Shu dkk juga melaporkan bahwa uji ini bermanfaat sebagai uji penapisan (*screening*) di bandar udara terhadap kasus dengue dari luar negeri.⁴⁷

2.2.4 Deteksi Materi Genetik

Deteksi materi genetik, misalnya dengan RT-PCR, merupakan perangkat diagnostik yang mempunyai sensitifitas dan spesifitas sangat baik. RT-PCR lebih sensitif dibandingkan dengan isolasi virus.⁶

RT PCR menunjukkan sensitifitas sebesar 94% untuk DENV-1, 93% untuk DENV-2, dan 100% untuk DENV-3 dan DENV-4, jika dibandingkan dengan isolasi virus.⁴⁸

Keuntungan lain adalah dapat digunakan untuk mendeteksi serotipe virus dengue. Selain itu, tidak terjadi reaksi silang antar serotipe maupun dengan flavivirus lainnya.⁶

Sayangnya, pemeriksaan ini masih relatif mahal, membutuhkan teknisi yang terlatih, dan sulit untuk diaplikasikan dalam skala besar.¹³

2.3 Produksi Antibodi IgG pada Kelinci

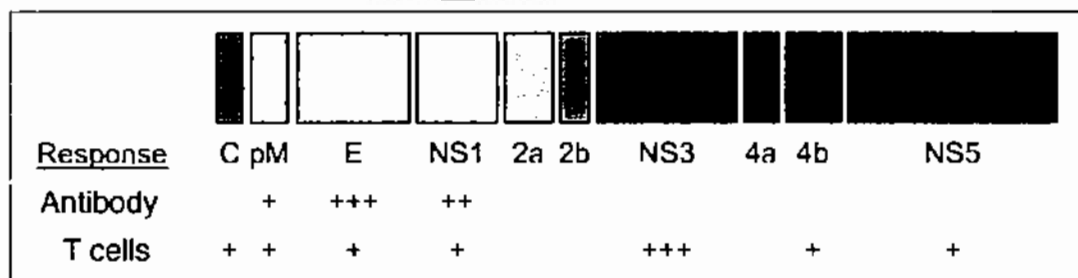
Hewan yang sering digunakan untuk memproduksi antibodi poliklonal di laboratorium adalah kelinci, mencit, hamster, guinea pig, goat, sheep, dan ayam. Di antara hewan tersebut, yang paling sering dipakai adalah kelinci karena ukurannya yang sedang, relatif mudah ditangani dan diambil darahnya, usia hidup yang relatif lama, dan mampu memproduksi antibodi dengan titer dan afinitas yang tinggi.⁴⁹

Untuk menginduksi terbentuknya antibodi poliklonal, kelinci disuntik dengan antigen yang sudah dicampur dengan adjuvant. Fungsi adjuvant adalah membantu mencetuskan respon imun yang efektif, terutama jika daya imunogenik antigen lemah. Ada beberapa macam adjuvant, antara lain adalah Freund's complete adjuvant (FCA), Freund's incomplete adjuvant (FIA), garam aluminum (misalnya Al(OH)₃, AlPO₄), Quil A, Iscoms, Montanide, TiterMax™, dan RIBI™.⁴⁹

FCA paling sering digunakan pada produksi antibodi poliklonal karena titer antibodi yang diinduksi tinggi pada hampir semua jenis antigen. Antigen dilepaskan dari adjuvant ini secara perlahan sehingga cukup lama tersedia untuk diendositososis dan dipresentasikan. Cara pemberian FCA adalah melalui suntikan subkutan.⁴⁹

Suntikan booster dibutuhkan untuk memperkuat afinitas antibodi. FCA tidak boleh digunakan pada suntikan booster karena dapat menyebabkan reaksi jaringan hebat. Sebagai gantinya digunakan FIA.⁴⁹

Setelah penyuntikan campuran antigen/adjuvant, maka akan terjadi stimulasi imunitas humoral dan imunitas yang dimediasi sel (Gambar 9). Hasilnya diharapkan terjadi pembentuk antibodi terhadap antigen yang disuntikan.⁴⁹



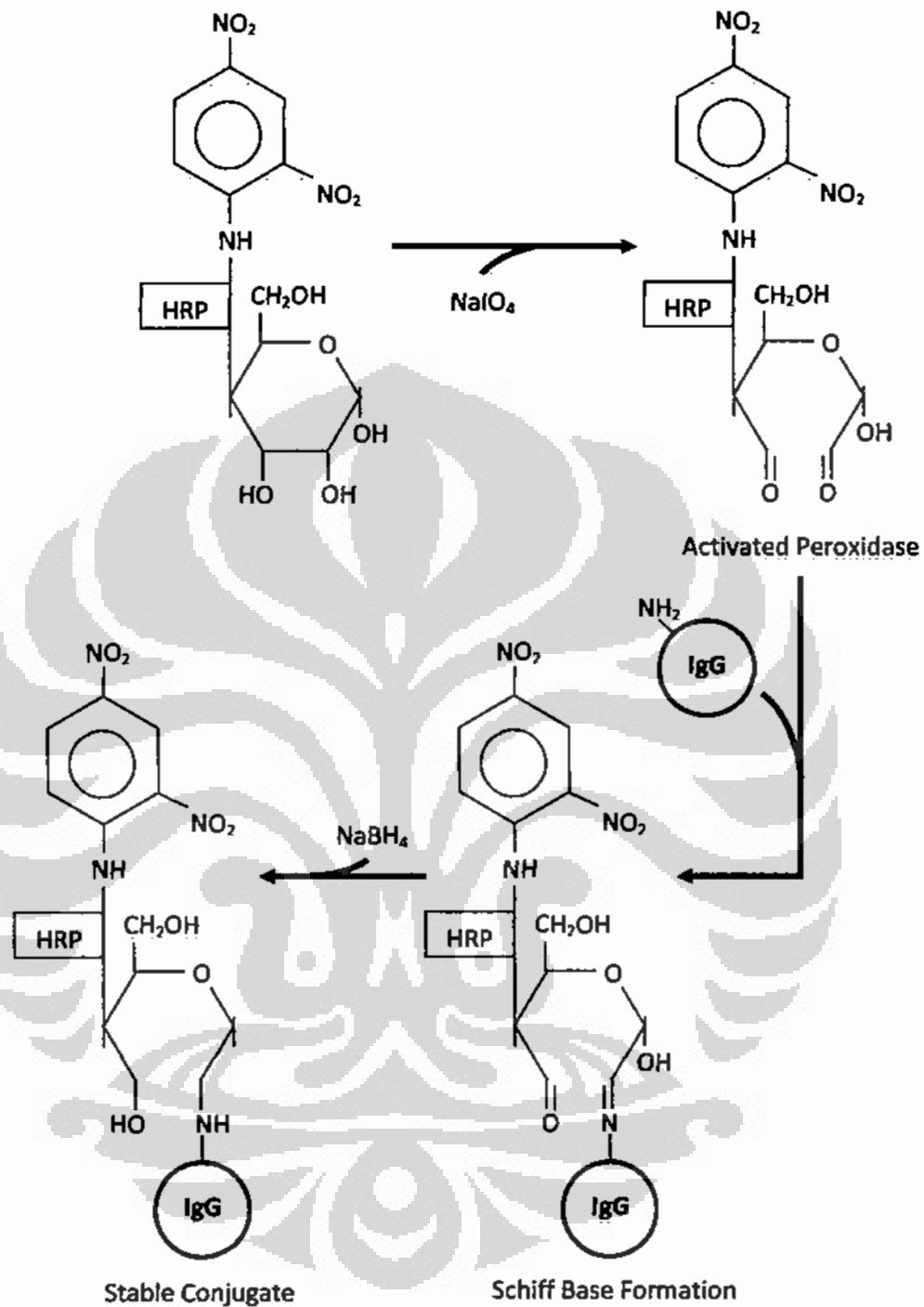
Gambar 9. Respon antibodi dan sel T terhadap protein virus dengue.⁵⁰

2.4 Pelabelan Antibodi IgG dengan HRP

Konjugasi antara enzim dan antibodi melibatkan pembentukan ikatan kovalen yang stabil antara enzim (misalnya HRP) dengan antibodi. Pembentukan ikatan ini tidak boleh mengganggu bagian aktif dari antibodi, juga tidak merusak fungsi enzim.

Reaksi kimia pembentukan ikatan kovalen antara antibodi IgG dengan HRP disajikan dalam Gambar 10.⁵¹





Gambar 10. Konjugasi *Horseradish Peroxidase* (HRP) dengan antibodi (IgG) menggunakan metode periodat. Metode ini terdiri dari tiga tahap: (1) Natrium periodat (NaIO_4) mengoksidasi rantai samping karbohidrat dari HRP; (2) Pembentukan basa Schiff antara peroksidase yang sudah teraktivasi dengan gugus amino antibodi; dan (3) Natrium borohidrat (NaBH_4) mereduksi basa Schiff untuk membentuk konjugasi yang stabil.⁵¹

BAB III

BAHAN DAN CARA KERJA

3.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi, Departemen Mikrobiologi, FKUI mulai bulan Juni 2009 sampai Mei 2010.

3.2 Bahan

3.2.1 Antigen GST-NS1

Gen NS1 diperoleh dari DENV-2 strain DS-3106 koleksi Departemen Mikrobiologi FKUI yang berasal dari pasien DBD di Jakarta tahun 2006. Sekuens lengkap Gen NS1 yang digunakan disajikan pada lampiran 1.

Ekspresi protein NS1 dilakukan pada penelitian sebelumnya.⁵² Secara singkat, cDNA gen NS1 hasil *reverse genetic* dari strain DS-3106 diinsersikan pada plasmid pGEX-6P-1 (Amersham Pharmacia Biotech, 1997). Plasmid yang mengandung fusi GST-NS1 (pGEXD₂NS1.12) ditransformasi ke *E. coli* strain BL21. Bakteri *E. coli* digunakan untuk memproduksi protein GST-NS1. Protein NS1 yang dihasilkan adalah protein NS1 utuh yang masih menyatu dengan protein GST (GST-NS1). Prosedur ekspresi protein sesuai dengan prosedur Sambrook et al 1989. Purifikasi protein GST-NS1 dilakukan menggunakan *Bulk GST Purification Modules* (GE Healthcare, 2006).

3.2.2 Kelinci

Pada penelitian ini digunakan 3 ekor kelinci betina jenis *New Zealand White* usia 3-4 bulan berat sekitar 2,5 kg.

3.2.3 HRP

Horseradish Peroxidase (HRP) diperoleh dari Sigma Aldrich, Missouri. Penyimpanan dilakukan pada suhu 4°C.

3.3 Strategi Penelitian

Penelitian ini dilakukan dengan beberapa tahapan kerja, meliputi: (1) produksi antibodi; (2) purifikasi antibodi; (3) pelabelan antibodi; (4) pemeriksaan hasil pelabelan.

3.4 Cara Kerja

3.4.1 Pemeriksaan Serum Kelinci Pre-Imunisasi dengan Dot Blot

Dot blot mengikuti metode yang telah dijelaskan sebelumnya, dengan beberapa modifikasi.⁵³

Sebanyak 1 µl supernatan DENV-2 direkatkan ke membran nitroselulose (Hybond-C Extra, Amersham Bioscience, UK) yang telah dipotong-potong dengan ukuran sekitar 0,5 cm x 0,5 cm. Membran kemudian diinkubasi dengan *blocking buffer* (5% skim milk [Tropicana Slim, PT. Nutrifood Indonesia, Jakarta] dalam PBS pH 7,3) selama semalam pada suhu 4°C. Setelah proses *blocking* selesai, membran dicuci menggunakan dapar pencuci (0,01% tween-20 dalam PBS) dilanjutkan dengan menginkubasi membran dengan serum kelinci pre-imunisasi S0K01, S0K02, dan S0K03 dengan pengenceran 1:1000. Inkubasi berlangsung selama 1 jam pada suhu ruang. Membran dicuci dengan PBS/Tween dilanjutkan inkubasi dengan *goat antirabbit IgG-biotin* (1:1000), kemudian setelah pencucian ditambahkan lagi dengan streptavidin-HRP.

Setelah selesai, membran dicuci kembali dengan dapar pencuci dilanjutkan dengan menginkubasi membran dengan substrat DAB (3 mg diaminobenzidine

dalam 5 mL PBS dan 5 μ L H₂O₂ 30%) (Sigma Aldrich, Missouri) dan diinkubasi selama 5 menit pada kondisi gelap. Reaksi dihentikan dengan menambahkan air. Hasil pembacaan dalam bentuk kualitatif.

Kontrol negatif adalah membran nitroselulose yang tidak dilapisi antigen dan membran dengan antigen tetapi tanpa antibodi I, untuk kontrol positif adalah serum pasien positif infeksi DENV-2 berdasarkan RT-PCR.

3.4.2 Produksi Antibodi Anti-NS1 DENV-2 Dengue Pada Kelinci

Untuk penyuntikan pertama, antigen GST-NS1 (4 μ g/ μ l) dilarutkan dalam Freund's complete adjuvant (FCA) (Sigma Aldrich, Missouri). Sedangkan untuk booster, antigen NS1 dilarutkan dalam Freund's incomplete adjuvant (FIA) (Sigma Aldrich, Missouri). Penyuntikan dilakukan secara subkutan, 4 lokasi di daerah punggung, masing-masing berjarak sekitar 2,5 cm. Booster dilakukan pada minggu ke-3, 5, dan 7 setelah penyuntikan pertama. Darah diambil dari arteri sentral telinga. Pengambilan darah pertama sebanyak 5 cc dilakukan pada minggu pertama. Selanjutnya pengambilan darah sebanyak 20 – 25 cc dilakukan pada minggu ke-6, 8, dan 9. Darah dimasukkan ke dalam tabung tanpa EDTA, lalu disentrifugasi dengan kecepatan 1500 rpm pada suhu ruang selama 15 menit. Serum diambil dan disimpan di suhu -80°C.

Setiap kelinci dilakukan penyuntikan antigen GST-NS1 dengan dosis yang berbeda, yaitu 100 μ g/100 μ l dan 200 μ g/200 μ l.

3.4.3 Pemeriksaan Antibodi Anti-NS1 DENV-2 Serum Kelinci dengan Metode *Indirect* ELISA

Metode pemeriksaan *inderect* ELISA dilakukan seperti dijelaskan sebelumnya.¹³

Sumur ELISA (Disposable Products Pty. Ltd, South Australia) dilapisi dengan 100 μ l NS1 (2,3 μ g/ μ l) 1:25 dalam *coating buffer* selama semalam pada suhu 4°C. Kemudian sumur diinkubasi dengan 300 μ l *blocking buffer* (5% *skim milk* dalam PBS pH 7,3) selama 1 jam pada suhu ruang. Sumur dicuci dengan 300 μ l *washing buffer* (PBS/Tween 20) sebanyak 3 kali, kemudian diinkubasi dengan serum kelinci SIK01, SIIK01, SIIK01, SIK03, SIIK03, dan SIIK03 dengan pengenceran 1:50 selama 1 jam pada suhu 37°C. Setelah dicuci dengan *washing buffer*, sumur diinkubasi dengan *goat antirabbit IgG HRP* (Sigma Aldrich, Missouri) dengan pengenceran 1:5000 dalam *skim milk* 1% selama 1 jam pada suhu 37°C. Setelah dicuci ditambahkan 100 μ l substrat TMB peroksidase (Kirkegaard & Perry Laboratories, Maryland) dan dibiarkan 10 menit pada suhu ruang. Kemudian reaksi dihentikan dengan penambahan 100 μ l H₂SO₄ 3N. Nilai absorbansi diukur dengan *ELISA reader* (Bio-Rad Model 550, California) pada panjang gelombang 450 nm. Hasil pembacaan dalam bentuk kuantitatif.

Sebagai kontrol negatif digunakan serum kelinci preimunisasi dan sumur yang tidak dilapisi antigen.

3.4.4 Purifikasi Antibodi IgG dari Serum Kelinci

Untuk memurnikan IgG dari serum kelinci yang telah diimunisasi, digunakan kolom sephadex G-200 (Pharmacia, Swedia). Secara singkat, 1 ml serum kelinci dimasukkan ke dalam kolom sephadex berukuran 5 cm dan diameter 1 cm. Tetesan ditampung dalam tabung. Setiap tabung berisi 5 tetes atau sekitar 250 μ l. Setelah tetesan habis, kolom sephadex dibilas dengan 1 ml Na₂HPO₄. Tetesan juga ditampung dalam tabung dan setiap tabung berisi 5 tetes.

Kemudian dibilas kembali dengan 1 ml Na_2HPO_4 , semua tetesan ditampung dalam satu tabung.

Hasil fraksinasi sephadex di uji dengan *indirect* ELISA untuk menentukan fraksi mana yang mengandung antibodi anti-NS1.

Indirect ELISA dilakukan dengan cara yang telah dijelaskan sebelumnya. Protein yang dilapiskan adalah NS1 dalam *coating buffer* (1:25). Antibodi I adalah hasil fraksinasi dengan pengenceran 1:25 dalam *skim milk* 1%. Antibodi II adalah *goat antirabbit* IgG HRP (Sigma Aldrich, Missouri) dengan pengenceran 1:5000 dalam *skim milk* 1%.

Sebagai kontrol negatif digunakan serum kelinci preimunisasi dan sebagai kontrol positif digunakan serum kelinci positif IgG anti-NS1.

3.4.5 Pelabelan Antibodi IgG Kelinci dengan HRP

Konjugasi IgG dengan HRP dilakukan dengan metode periodat dengan beberapa modifikasi.⁵⁴

Dilakukan aktivasi HRP dengan cara melarutkan 2 mg HRP (Sigma Aldrich, Missouri) dalam 0,5 ml DDW, lalu ditambahkan 0,2 ml NaIO_4 0,1 M yang baru dibuat. Kemudian diinkubasi dalam suhu ruang selama 2 jam sampai warna berubah menjadi hijau, lalu dididialisis dalam 100 volume lebih natrium asetat buffer 1 mM (pH 4,4) pada suhu 4°C selama semalam menggunakan membran dialisis (Spectrapor, Fischer Scientific Co., Pittsburgh).

Secara bersamaan, 1 ml serum kelinci basil purifikasi didialisis dalam 100 volume lebih natrium carbonat buffer 10 mM (pH 9,5) pada suhu 4°C selama semalam.

Konjugasi HRP dengan IgG dilakukan dengan cara mencampurkan HRP yang sudah didialisis dan ditambahkan 10 µl natrium carbonat buffer 0,2 M pH 9,5 dengan IgG yang sudah didialisis. Hasil campuran kemudian dimasukkan ke dalam tabung yang telah diselubungi dengan *aluminium foil*, lalu diinkubasi pada suhu ruang selama 2 jam. Kemudian ditambahkan dengan 100 µl NaBH₄ yang baru dibuat lalu didialisis dalam 100 volume lebih PBS pada suhu 4°C selama semalam.

Untuk menghilangkan HRP yang tidak terkonjugasi dilakukan presipitasi dengan ammonium sulfat. Sebanyak 1 ml hasil dialisis sebelumnya ditambah 0,5 ml ammonium sulfat jenuh dan dibiarkan selama 15 menit dalam suhu ruang. Dilakukan sentrifugasi pada kecepatan 6000 rpm selama 15 menit, kemudian supernatan dibuang. Pelet ditambahkan 200 µl PBS (-) lalu didialisis dalam 100 volume lebih PBS (-) selama semalam pada suhu 4°C. Hasil dialisis lalu disimpan di suhu -20°C sampai digunakan.

3.4.6 Dot Blot Hasil Pelabelan Antibodi Anti-NS1 DENV-2

Metode dot blot dilakukan seperti yang telah dijelaskan sebelumnya. Hanya saja pada pemeriksaan kali ini yang dilapiskan adalah protein NS1 sebanyak 1 µl (2,3µg) dan digunakan satu antibodi, yaitu antibodi hasil pelabelan dengan HRP. Antibodi berlabel HRP diencerkan dengan pengenceran 1:100; 1:200; 1:400; 1:800; 1:1600; 1:3200; 1:6400; 1:12800.

Kontrol negatif adalah membran nitroselulose dilapisi dengan serum pasien negatif dengue dan tanpa protein NS1.

3.4.7 *Direct* ELISA Hasil Pelabelan Antibodi Anti-NS1 DENV-2

Hasil pelabelan diperiksa dengan metode *direct* ELISA. Prosedur pemeriksaannya seperti yang telah dijelaskan sebelumnya. Antibodi yang digunakan hanya satu, yaitu antibodi anti-NS1 yang telah dilabel HRP dengan pengenceran 1:100; 1:200; 1:400; 1:800; 1:1600; 1:3200; 1:6400; 1:12800.

Kontrol negatif adalah sumur yang tidak dilapisi dengan protein NS1.

3.4.8 *Indirect* ELISA terhadap Serum Kelinci SIK03

Pemeriksaan *indirect* ELISA seperti yang telah dijelaskan sebelumnya. Pada sumur ELISA dilapiskan protein NS1 rekombinan 1:25. Antibodi I adalah serum SIK03 dengan pengenceran 1:100; 1:200; 1:400; 1:800; 1:1600; 1:3200; 1:6400; 1:12800. Antibodi II digunakan *goat antirabbit* IgG HRP.

Sebagai kontrol negatif adalah antibodi I menggunakan serum kelinci preimunisasi dan tanpa antibodi I.

BAB IV







HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Hasil

4.1.1 Antibodi IgG Anti-NS1 Dengue pada Serum Kelinci

Sebelum imunisasi, serum ketiga kelinci (K01,K02,K03) diambil kemudian diperiksa dengan metode *dot blot*. Antigen yang dilapiskan pada membran adalah DENV-2 dari biakan sel. Hasilnya, dua kelinci negatif antibodi terhadap DENV-2 (K01 dan K03) dan satu kelinci positif (K02) (Tabel 1). K02 dikeluarkan dari penelitian.

Tabel 1. Pemeriksaan Serum Kelinci K01,K02,K03, Sebelum Imunisasi dengan Protein GST-NS1 Menggunakan Metode Dot Blot.

Antigen	DENV 2	DENV 2	DENV 2	DENV 2	DENV 2	DENV 2
Antibodi I	S0K01 (1:1000)	S0K02 (1:1000)	S0K03 (1:1000)	SP[+] (1:1000)	-	-
Antibodi II	Goat antirabbit IgG Biotin (1:1000)					Goat antihuman IgG HRP (1:1000)
Dot Blot						
Ket				K[+]	K[-]	K[-]

* SP[+]: serum manusia positif dengue; K[+]: kontrol positif; K[-]: kontrol negatif.

Setelah penyuntikan dengan antigen GST-NS1, dilakukan tiga kali pengambilan darah. Pengambilan darah I dilakukan pada minggu ke-6 sejak penyuntikan. Serum yang dihasilkan diberi kode SIK01 dan SIK03. Pengambilan

darah II dan III dilakukan berturut-turut pada minggu ke ke-8 dan 9. Serum yang diperoleh diberi kode SIK01, SIK03, SIIK01, dan SIIK03.

Semua serum tersebut kemudian diperiksa menggunakan *indirect* ELISA untuk mengetahui apakah terbentuk antibodi anti-NS1 dengue. Dari hasil pemeriksaan, absorbansi di atas nilai kontrol negatif ($0,106 \pm 0,001$) ditemukan pada semua serum. Absorbansi tertinggi berada pada serum SIIK01 ($2,290 \pm 0,001$) dan SIIK03 ($2,266 \pm 0,005$) (Tabel 2).

Tabel 2. Pemeriksaan Antibodi Anti-NS1 Pada Serum Kelinci K01 dan K03 dengan *Indirect* ELISA

Sampel	Antibodi I	OD ₄₅₀	Ket
K01	SIK01	$1,793 \pm 0,185$	
	SIIK01	$1,903 \pm 0,042$	
	SIIK01	$2,290 \pm 0,001$	
K03	SIK03	$2,032 \pm 0,030$	
	SIIK03	$2,201 \pm 0,046$	
	SIIK03	$2,266 \pm 0,005$	
-	SK[-]	$0,106 \pm 0,001$	K[-]
-	-	$0,089 \pm 0,001$	K[-]

Ket:

* SK[-]: serum kelinci preimunisasi; K[-]: kontrol negatif.

* Antigen digunakan NS1 rekombinan

* Antibodi II digunakan goat antirabbit IgG-HRP

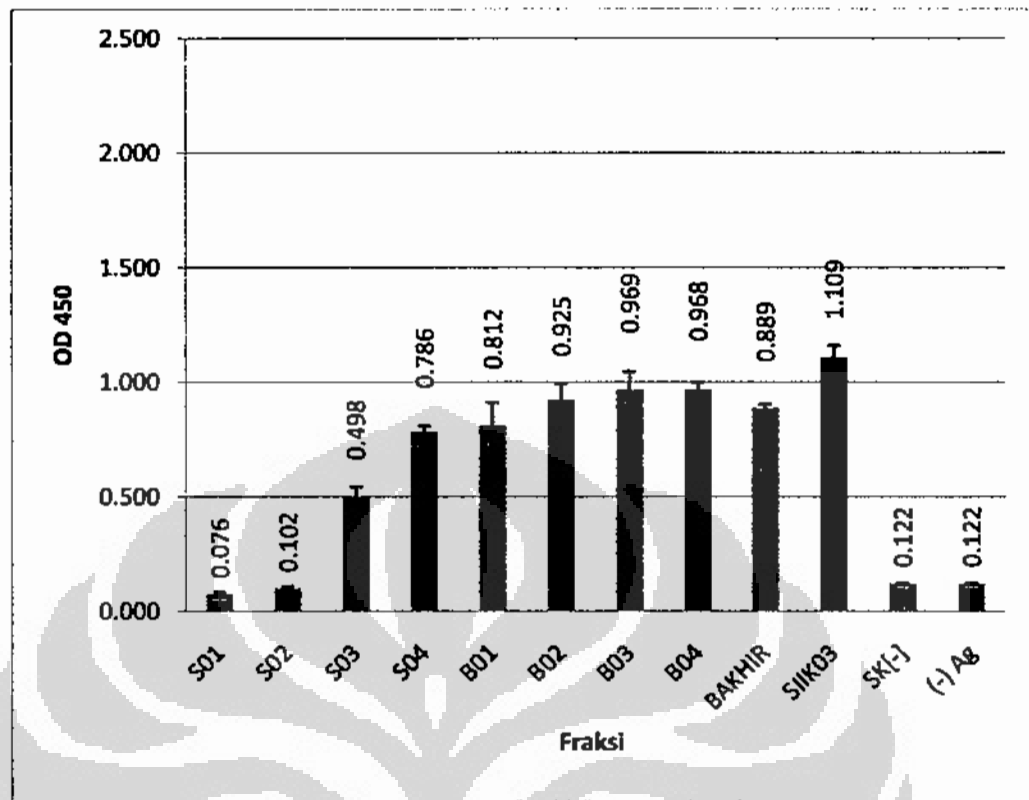
Dari hasil di atas, maka keenam serum kelinci dapat digunakan untuk proses pelabelan. Pada awalnya digunakan serum kelinci SIIK03 dan SIIK01 untuk pemeriksaan dot blot dan ELISA, serta digunakan juga pada proses pelabelan. Tetapi karena jumlahnya semakin terbatas, maka pada akhirnya digunakan serum SIIK03.

4.1.2 Purifikasi Antibodi IgG Serum Kelinci

Untuk memurnikan IgG dari serum kelinci yang telah diimunisasi, digunakan sephadex G-200. Sebanyak 1 ml serum SIK03 dilewatkan pada kolom yang berisi sephadex G-200 dan ditampung setiap 5 tetes untuk satu tabung. Hasilnya adalah S01, S02, S03, dan S04. Setelah itu, kolom sephadex dibilas dengan 1 ml Na_2HPO_4 , tetesan ditampung lagi setiap 5 tetes untuk satu tabung. Hasilnya diberi kode B01, B02, B03, dan B04. Kemudian, kolom dibilas lagi dengan 1 ml Na_2HPO_4 , semua tetesan ditampung dalam satu tabung dan diberi kode B_{AKHIR}.

Semua hasil purifikasi diperiksa menggunakan *indirect* ELISA. Sebelumnya sumur ELISA dilapiskan dengan protein NS1 rekombinan. Serum yang akan diperiksa dilakukan pengenceran 1:25. Tujuan dari pemeriksaan ini adalah untuk mengetahui pada fraksi mana antibodi anti-NS1 berada.

Dari pemeriksaan terlihat bahwa absorbansi di atas kontrol negatif berada pada fraksi S03, S04, B01, B02, B03, B04, dan B_{AKHIR} (Gambar 11). Dengan pertimbangan terbatasnya kapasitas membran dialisis, maka hanya fraksi B01, B02, B03, B04 yang akan dilakukan pelabelan lebih lanjut. Gabungan dari keempat fraksi ini diberi kode B_{GAB}. Pelabelan dengan HRP dilakukan terhadap B_{GAB} dan hasilnya diberi kode SIK03-HRP.



Gambar 11. Pemeriksaan antibodi anti-NS1 pada hasil purifikasi serum kelinci dengan Sephadex G-200 menggunakan metode *indirect* ELISA. Ket: SK[-]: serum kelinci praimunisasi; (-) Ag: tanpa antigen. Biru: SIIK03 hasil fraksinasi; merah: kontrol positif; hijau: kontrol negatif.

4.1.3 Dot Blot Hasil Pelabelan Antibodi Anti-NS1 DENV-2

Hasil pelabelan dengan HRP diperiksa dengan metode dot blot. Pada membran nitroselulose direkatkan 1 μ l (2,3 μ g) protein NS1. Setelah pencucian ditambahkan antibodi yang telah dilabel HRP dengan pengenceran serial.

Tujuan pemeriksaan ini adalah untuk mengetahui apakah SIIK03HRP dapat mendeteksi protein NS1 yang direkatkan pada membran nitroselulosa.

Dari pemeriksaan diketahui bahwa SIIK03HRP dapat mendeteksi protein NS1 sampai tingkat pengenceran 1:1600 (Tabel 3).

Tabel 3. Pemeriksaan SIIK03 HRP dengan Metode Dot Blot

Ag	Protein NS1(2,3µg)							
Ab	SIIK03HRP							
	1:100	1:200	1:400	1:800	1:1600	1:3200	1:6400	1:12800
Dot Blot								
Ket								
Ag	SP[-]	-						
Ab	SIIK03HRP							
	1:100	1:100						
Dot Blot								
Ket	K[-]	K[-]						

* SP[-]: serum pasien negatif dengue;
 ** K[-]: kontrol negatif.

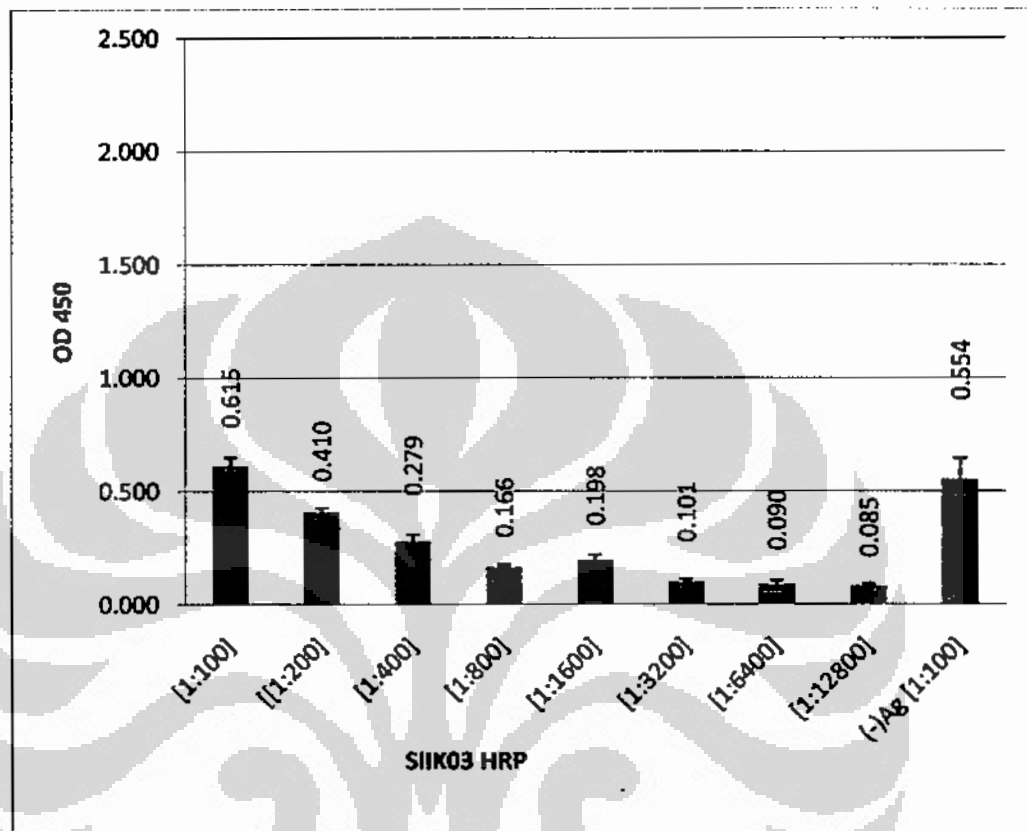
4.1.4 Direct ELISA Hasil Pelabelan Antibodi Anti-NS1 DENV-2

Hasil pelabelan dengan HRP juga diperiksa menggunakan metode *direct* ELISA. Sumur ELISA dilapisi terlebih dahulu dengan protein NS1 rekombinan kemudian ditambahkan dengan antibodi yang telah dilabel HRP yang diencerkan secara serial.

Tujuan pemeriksaan ini adalah untuk mengetahui apakah SIIK03 dapat mendeteksi protein NS1 yang dilapiskan pada sumur ELISA.

Hasil pemeriksaan menunjukkan bahwa absorbansi tertinggi terjadi pada pengenceran 1:100 ($0,615 \pm 0,035$) dan terendah pada pengenceran 1:12800

(0,085 ± 0,008). Tetapi, absorbansi kontrol negatif tanpa antigen menunjukkan nilai yang tinggi yaitu 0,554 ± 0,092 (Gambar 12).

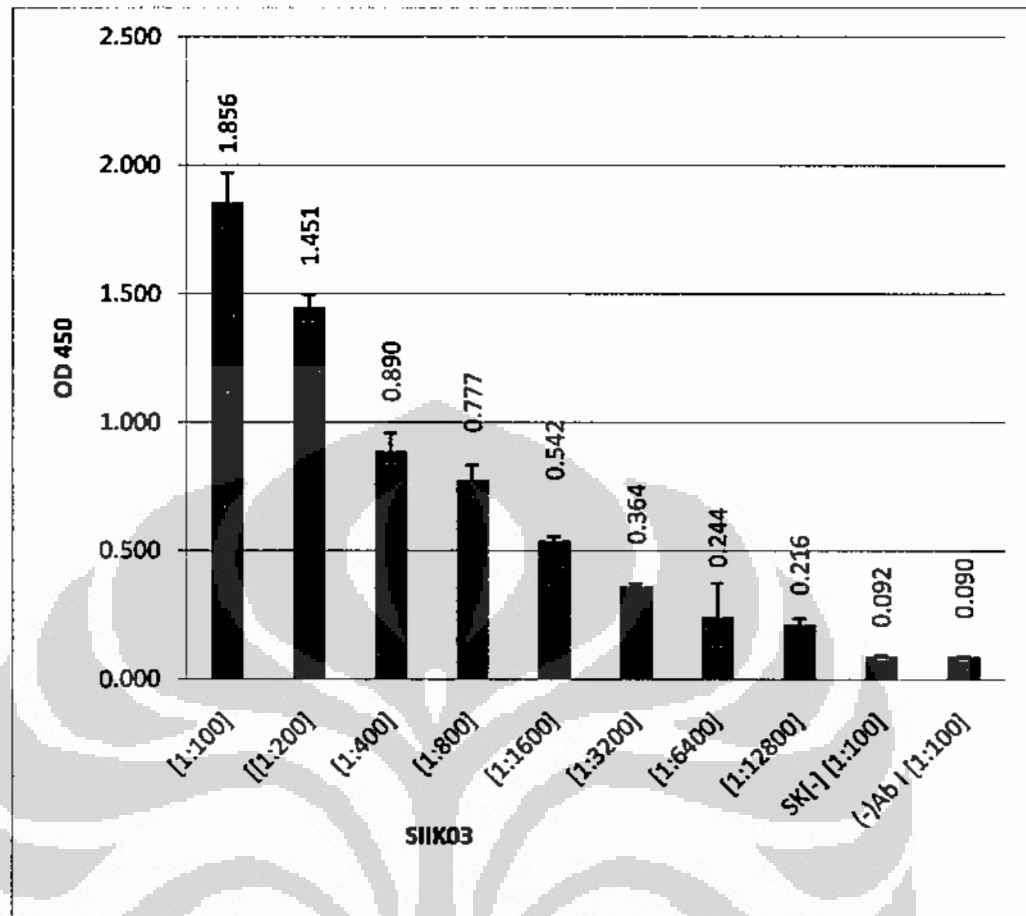


Gambar 12. Pemeriksaan kemampuan deteksi SIIK03HRP terhadap protein NS1 menggunakan metode *direct* ELISA. Ket: (-)Ag: tanpa antigen. Biru: SIIK03HRP; hijau: kontrol negatif.

4.1.5 *Indirect* ELISA Serum Kelinci SIIK03

Tujuan dari pemeriksaan ini adalah untuk mengetahui kemampuan deteksi antibodi anti-NS1 SIIK03 terhadap protein NS1 rekombinan dengan metode *indirect* ELISA.

Caranya adalah dengan melapiskan protein NS1 pada sumur ELISA, kemudian setelah pencucian ditambahkan serum kelinci SIIK03 yang telah diencerkan secara serial. Setelah pencucian kembali, ditambahkan *goat antirabbit* IgG HRP.



Gambar 13. Pemeriksaan antibodi anti-NS1 SIIK03 menggunakan metode *indirect* ELISA. Ket: SK[-]: serum kelinci praimunisasi; (-) Ab I: tanpa antibodi I. Biru: SIIK03; hijau: kontrol negatif.

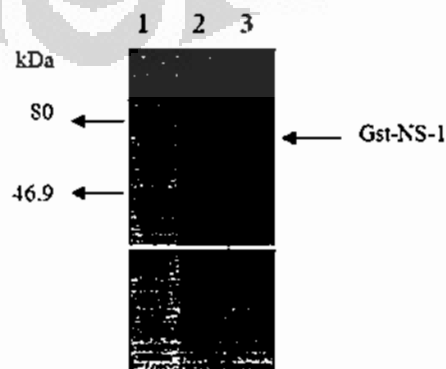
Hasil pemeriksaan memperlihatkan bahwa serum kelinci SIIK03 pada tingkat pengenceran 1:100 mempunyai absorbansi tertinggi yaitu $1,856 \pm 0,115$. Absorbansi semakin menurun dan terendah pada pengenceran 1:12800 yaitu $0,216 \pm 0,020$. Absorbansi pada semua tingkat pengenceran masih di atas absorbansi kontrol negatif yaitu $0,092 \pm 0,001$ (Gambar 13).

4.2 Pembahasan

Protein NS1 adalah protein non struktural yang relatif lestari pada keempat serotipe dengue. Oleh karena itu ideal untuk dijadikan target deteksi menggunakan antibodi spesifik.

Protein yang digunakan pada penelitian ini adalah protein yang diperoleh dari ekspresi gen NS1 DENV-2 DS-3106 (1009bp). Perbandingan sekuens gen NS1 DENV-2 DS3106 dengan sekuens lain menggunakan *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) menghasilkan 1160 sekuens yang mempunyai kemiripan. Dari semua sekuens tersebut, yang mempunyai *query coverage* 99% - 100% sebanyak 877, sisanya mempunyai *query coverage* antara 2% - 53%. Dari 877 sekuens dengan *query coverage* 99%-100%, tingkat kemiripannya berkisar 87% - 99% (Lampiran 2). Perlu penelitian lebih lanjut untuk menentukan apakah perbedaan sekuens ini mempengaruhi jenis epitop dan spesifitas antibodi yang diinduksi.

Antigen yang digunakan diperoleh dari penelitian sebelumnya.⁵² Antigen tersebut masih dalam bentuk GST-NS1 (berat molekul sekitar 72 kDa). Untuk mengkonfirmasi kebenaran ekspresi GST-NS1, dilakukan pemeriksaan *western blot*, hasilnya pada Gambar 14.



Gambar 14. Hasil uji western blot protein GST-NS-1 dengan antibodi monoklonal anti-GST. Ket: Lajur 1. Marka protein; 2. Elusi pellet; 3. Elusi supernatant.⁵²

GST (Glutathione S-Transferase) merupakan protein dengan berat molekul kurang lebih 26 kDa, yang berasal dari cacing *Schistosoma japonicum*. GST umumnya digunakan untuk menghasilkan protein fusi. GST yang berfungsi sebagai “tag” ini terdiri dari 220 asam amino. GST difusikan dengan protein pada ujung amino (*N-terminus*).⁵¹

Antigen yang disuntikkan ke kelinci dalam bentuk GST-NS1 karena pada saat penyuntikan protein ini belum berhasil dipisahkan. Oleh karena itu, antibodi yang diinduksi juga terhadap GST dan NS1. Untuk menentukan apakah adanya antibodi anti-GST pada serum kelinci mempengaruhi atau tidak kemampuan deteksi antibodi anti-NS1 baik pada serum kelinci maupun serum manusia, perlu dilakukan penelitian lanjutan.

Protein GST-NS1 merupakan hasil ekspresi pada *E. coli*. Karena ekspresi pada sel prokariot, maka tidak terjadi modifikasi pasca translasi yang penting untuk pembentukan epitop konformasional. Walaupun demikian, selain epitop konformasional, NS1 mempunyai beberapa epitop linear. Chunya Puttikhunt dkk menemukan 3 epitop (NS1-1F, NS1-3F and NS1-4) linear protein NS1.³¹ Sedangkan Falconar dkk mengidentifikasi 4 epitop linear protein NS1 (LD2, 24A, LX1 and 24C) dan Young dkk mengidentifikasi 6 epitope linear protein NS1 (1H7.4; 2C9.4; 5H4.4; 4H3.4; 3D1.4; 3A5.4).⁵⁵

Penyuntikan antigen GST-NS1 dilakukan dengan dua dosis berbeda yaitu 100 µg untuk K01 dan 200 µg untuk K03, baik pada suntikan pertama kali maupun pada tiga suntikan *booster* selanjutnya. Dari hasil pemeriksaan *indirect* ELISA, diketahui ternyata induksi antibodi anti-NS1 terjadi pada keenam jenis

serum K01 dan K03. Induksi antibodi anti-NS1 lebih tinggi pada K03 dibandingkan dengan K01 untuk serum SI ($2,032 \pm 0,030$ vs $1,793 \pm 0,185$) dan SII ($2,201 \pm 0,046$ vs $1,903 \pm 0,042$). Tetapi untuk SIII ($2,266 \pm 0,005$ vs $2,290 \pm 0,001$), nilainya hampir sama. Walaupun mempunyai nilai yang sedikit berbeda, keenam jenis serum dapat dilakukan proses pelabelan dengan HRP.

Pada penelitian ini, antibodi poliklonal yang akan dipurifikasi adalah IgG yang mempunyai berat molekul sekitar 146 kDa. Teknik purifikasi adalah dengan kolom kromatografi menggunakan sephadex G-200. Dipilihnya sephadex G-200 karena dapat membantu purifikasi protein dengan berat molekul antara 100 kDa sampai 300 kDa.⁵⁶

Karena yang dibutuhkan adalah IgG yang spesifik terhadap protein NS1, maka pemeriksaan hasil purifikasi dilakukan dengan pemeriksaan *indirect* ELISA. Dari hasil ini terlihat bahwa antibodi anti-NS1 ditemukan pada fraksi S03, S04, B01, B02, B03, B04, dan B_{AKHIR} (Gambar 11). Akibat keterbatasan daya tampung membran dialisis, maka yang dilanjutkan ke proses pelabelan dengan HRP adalah 4 fraksi yaitu B01 – B04.

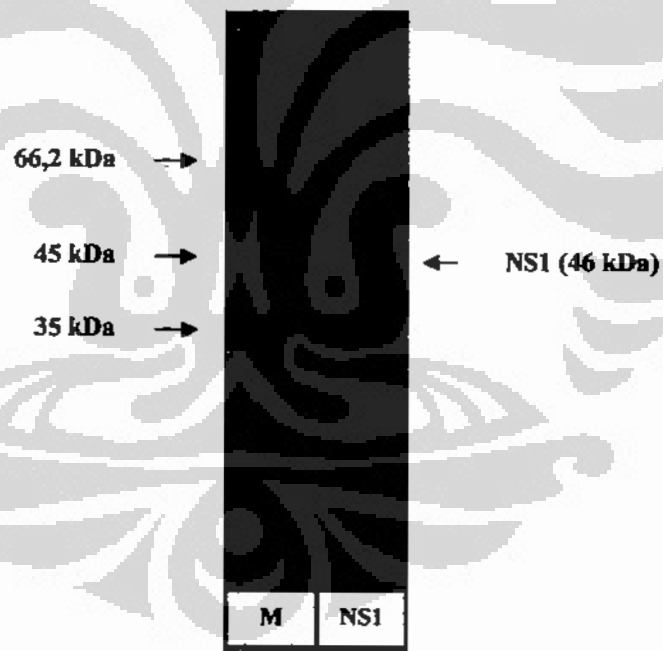
HRP merupakan salah satu enzim yang banyak digunakan dalam bidang diagnostik dan penelitian. Enzim ini dapat dipakai untuk pemeriksaan immunoblotting dan ELISA. Pemeriksaan ini dapat memberikan hasil yang dapat divisualisasi dan mempunyai sensitifitas yang baik. Selain itu, enzim yang digunakan dalam pelabelan mempunyai beberapa keuntungan dibandingkan dengan teknik fluoresens atau radioaktif. Enzim lebih stabil dan tidak mempunyai masalah keamanan seperti halnya label radioisotop. Selain itu, sensitifitasnya

hampir sama dengan radioimmunoassay. Keuntungan lain adalah alat yang digunakan tidak terlalu mahal dan rumit.⁵⁷

Pelabelan terbagi menjadi 3 tahap, yaitu aktivasi HRP, konjugasi HRP dengan IgG, dan presipitasi untuk membuang sisa-sisa HRP yang tidak terkonjugasi dengan IgG.

Karena pada pertengahan penelitian protein NS1 sudah berhasil dipisahkan dari protein GST, maka protein NS1 digunakan sebagai antigen dalam pemeriksaan hasil pelabelan.

Konfirmasi kebenaran protein NS1 hasil potongan melalui pemeriksaan SDS-PAGE disajikan pada Gambar 15.



Gambar 15. Hasil SDS PAGE Protein NS1 Rekombinan

Konfirmasi protein NS1 juga dilakukan dengan menggunakan Kit ELISA NS1 (Panbio Diagnostics, Australia). Hasilnya sebesar 0,826 (kontrol positif: 1,55 dan kontrol negatif: 0,156)

IgG yang telah dilabel diperiksa menggunakan metode dot blot dan ELISA. Kedua metode ini dipilih karena masing-masing mempunyai keunggulan dan kelemahan. Metode dot blot dapat memberikan hasil berupa visualisasi pada membran tempat antigen dilapiskan, tetapi hasilnya dalam bentuk kualitatif. Sedangkan pemeriksaan ELISA memberikan hasil kuantitatif, tetapi tidak dapat menunjukkan pada bagian mana antibodi pendeteksi menempel.

Pada pemeriksaan dot blot, antibodi yang dilabel dapat mendeteksi protein NS1 di membran nitroselulose sampai tingkat pengenceran 1:1600 (Tabel 4). Hal ini berarti pelabelan berhasil dilakukan.

Antibodi kelinci berlabel HRP tidak dapat digunakan untuk mendeteksi protein NS1 menggunakan *direct* ELISA. Walaupun absorbansi pada tingkat pengenceran 1:100 cukup besar yaitu $0,615 \pm 0,035$, tetapi kontrol negatif pada tingkat pengenceran yang sama juga besar yaitu $0,554 \pm 0,092$ (tanpa antigen) (Gambar 12).

Pada pemeriksaan *indirect* ELISA menggunakan serum SIIK03 yang tidak dilabel, terlihat bahwa sampai tingkat pengenceran 1:12800, SIIK03 masih dapat mendeteksi protein NS1 yang dilapiskan pada sumur ELISA (Gambar 13). Berbeda dengan SIIK03 yang telah dilabel dengan HRP, serum SIIK03 dengan *goat antirabbit* IgG HRP komersial mempunyai nilai kontrol negatif yang rendah, yaitu $0,090 \pm 0,001$ (tanpa antigen).

BAB V

KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

1. Penyuntikan kelinci dengan protein GST-NS1 berhasil menginduksi terbentuknya antibodi anti-NS1 pada serum kelinci.
2. Antibodi anti-NS1 berlabel HRP yang dikembangkan dapat mendeteksi protein NS1 pada pemeriksaan dot blot, tetapi tidak dapat digunakan untuk mendeteksi protein NS1 menggunakan pemeriksaan ELISA.

5.2 Saran

1. Protein yang disuntikkan sebaiknya protein murni NS1.
2. NS1 yang disuntikkan ke kelinci sebaiknya dilakukan modifikasi agar mirip dengan NS1 alami, sehingga antibodi yang dihasilkan tidak hanya mengenali epitop linear, tetapi juga epitop konformasional.
3. Perlu dilakukan optimasi lanjut proses pelabelan sehingga IgG anti-NS1 HRP mampu mendeteksi protein NS1 dengan pengenceran yang lebih rendah pada pemeriksaan dot blot, dan mampu mendeteksi protein NS1 pada pemeriksaan ELISA.

DAFTAR PUSTAKA

1. WHO (World Health Organization). *Dengue and dengue haemorrhagic fever* [Homepage on the internet]. c2009 [updated 2009 March; cited 2009 Nov 19]. Available from <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs117/en/print.html>
2. Tsai JJ, Chan KS, Chang JS, Chang K, Lin CC, et al. Effect of serotypes on clinical manifestations of dengue fever in adults. *J Microbiol Immunol Infect*. 2009 Dec;42(6):471-8.
3. Soedarmo SP. The epidemiology, prevention and control of dengue hemorrhagic fever in Indonesia. *Gaoxiong Yi Xue Ke Xue Za Zhi*. 1994 Dec;10 Suppl:S109-12.
4. Suroso T, Achmad H, Imran A. Dengue Haemorrhagic Fever Outbreaks in Indonesia 1997-1998. *Den Bulletin*. 1998;22:45-50.
5. Departemen Kesehatan RI. Data kasus DBD per bulan di Indonesia tahun 2010, 2009, dan 2008. Jakarta. 2010.
6. Gurugama P, Garg P, Perera J, Wijewickrama A, Seneviratne SL. Dengue viral infections. *Indian J Dermatol*. 2010;55(1):68-78.
7. Koraka P, Burghoorn-Maas CP, Falconar A, Setiati TE, Djamiatun K, et al. Detection of immune-complex-dissociated nonstructural-1 antigen in patients with acute dengue virus infections. *J Clin Microbiol*. 2003 Sep;41(9):4154-9.
8. Libraty DH, Young PR, Pickering D, Endy TP, Kalayanarooj S, et al. High circulating levels of the dengue virus nonstructural protein NS1 early in dengue illness correlate with the development of dengue hemorrhagic fever. *J Infect Dis*. 2002 Oct 15;186(8):1165-8.
9. Gubler DJ. Dengue and dengue hemorrhagic fever. *Clin Microbiol Rev*. 1998 Jul;11(3):480-96.
10. Groen J, Koraka P, Velzing J, Copra C, Osterhaus AD. Evaluation of six immunoassays for detection of dengue virus-specific immunoglobulin M and G antibodies. *Clin Diagn Lab Immunol*. 2000 Nov;7(6):867-71.
11. Lapphra K, Sangcharaswichai A, Chokephaibulkit K, Tiengrim S, Piriyaakarnsakul W, et al. Evaluation of an NS1 antigen detection for diagnosis of acute dengue infection in patients with acute febrile illness. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2008 Apr;60(4):387-91.
12. Phuong HL, Thai KT, Nga TT, Giao PT, Hung le Q, et al. Detection of dengue nonstructural 1 (NS1) protein in Vietnamese patients with fever. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2009 Apr;63(4):372-8.
13. Alcon S, Talarmin A, Debruyne M, Falconar A, Deubel V, Flamand M. Enzyme-linked immunosorbent assay specific to Dengue virus type 1 nonstructural protein NS1 reveals circulation of the antigen in the blood during the acute phase of disease in patients experiencing primary or secondary infections. *J Clin Microbiol*. 2002 Feb;40(2):376-81.
14. Halstead SB. *Dengue*. *Lancet*. 2007 Nov 10;370(9599):1644-52.
15. Shrestha B, Brien JD, Sukupolvi-Petty S, Austin SK, Edeling MA, et al. The development of therapeutic antibodies that neutralize homologous and heterologous genotypes of dengue virus type 1. *PLoS Pathog*. 2010 Apr 1;6(4):e1000823.

16. Amorim JH, Porchia BF, Balan A, Cavalcante RC, da Costa SM, et al. Refolded dengue virus type 2 NS1 protein expressed in *Escherichia coli* preserves structural and immunological properties of the native protein. *J Virol Methods*. 2010 Apr 23.
17. Suwandono A, Kosasih H, Nurhayati, Kusriastuti R, Harun S, et al. Four dengue virus serotypes found circulating during an outbreak of dengue fever and dengue haemorrhagic fever in Jakarta, Indonesia, during 2004. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2006 Sep;100(9):855-62.
18. Qi RF, Zhang L, Chi CW. Biological Characteristic of Dengue Virus and Potential Targets for Drugs Design. *Acta Biochim Biophys Sin*. 2008; 40(2):91-101.
19. Lidenbach BD, Thiel HJ, Rice CM. Flaviviridae: The Viruses and Their Replication. In: Knipe DM, Howley PM. *Fields Virology Fifth Edition*. Boston: Lippincott Williams & Wilkins, 2007; p. 1101-1151
20. Henchal EA, Putnak JR. The Dengue Viruses. *Clin Microbiol Rev*. 1990; 3(4):376-396
21. Leitmeyer KC, Vaughn DW, Watts DM, Salas R, Chacon IV, Ramos C, et al. Dengue Virus Structural Differences That Correlate with Pathogenesis. *J Virol*. 1999; 73(6):4738-4747
22. Pokidysheva E, Zhang Y, Battisti AJ, Bator-Kelly CM, Chipman PR, et al. Cryo-EM reconstruction of dengue virus in complex with the carbohydrate recognition domain of DC-SIGN. *Cell*. 2006 Feb 10;124(3):485-93.
23. Brooks AW, Johansson M, Criswell E, Jans DA, Vasudevan SG. The Interdomain Region of Dengue NS5 Protein Interacts with NS3 and Host Protein. *Dengue Bulletin*. 2002;26:155-160
24. Zhang W, Chipman PR, Corver J, Johnson PR, Zhang Y, Mukhopadhyay S, et al. Visualization of Membran Protein Domains by Cryo-electron Microscopy of Dengue Virus. *Nat Struct Biol*. 2003; 10(11):987-911
25. Seema, Jain SK. Molecular Mechanism of Pathogenesis of Dengue Virus: Entry and Fusion with Target Cell. *Indian J Clin Biochem*. 2005; 20(2):92-103
26. Miller Sven, Kastner S, Locker JK, Buhler S, Bartenschlager R. The Non-structural Protein 4A of Dengue Virus Is an Integral Membrane Protein Inducing Membrane Alterations in a 2K-regulated Manner. *J Biol Chem*. 2007;282(12):8873-8881
27. Ma L, Jones CT, Groesch TD, Kuhn RJ, Post CB. Solution Structure of Dengue Virus Capsid Protein Reveals Another Fold. *PNAS*. 2004;101(10):3414-3419
28. Modis Y, Ogata S, Clements D, Harrison SC. Structure of the Dengue Virus Envelope Protein After Membrane Fusion. *Nature*. 2004;427:313-319
29. Falconar AK, Young PR. Immunoaffinity purification of native dimer forms of the flavivirus non-structural glycoprotein, NS1. *J Virol Methods*. 1990 Dec;30(3):323-32.
30. Falconar AK, Young PR, Miles MA. Precise location of sequential dengue virus subcomplex and complex B cell epitopes on the nonstructural-1 glycoprotein. *Arch Virol*. 1994;137(3-4):315-26.
31. Puttikhunt C, Kasinrerak W, Srisa-ad S, Duangchinda T, Silakate W, et al. Production of anti-dengue NS1 monoclonal antibodies by DNA immunization. *J Virol Methods*. 2003 Apr;109(1):55-61.

32. Jiang L, Zhou JM, Yin Y, Fang DY, Tang YX, Jiang LF. Selection and identification of B-cell epitope on NS1 protein of dengue virus type 2. *Virus Res.* 2010 Jun;150(1-2):49-55.
33. Chen Y, Pan Y, Guo Y, Qiu L, Ding X, Che X. Comprehensive mapping of immunodominant and conserved serotype- and group-specific B-cell epitopes of nonstructural protein 1 from dengue virus type 1. *Virology.* 2010 Mar 15;398(2):290-8. Epub 2010 Jan 15.
34. Sekaran SD, Lan EC, Maheswarappa KB, Appanna R, Subramaniam G. Evaluation of a dengue NS1 capture ELISA assay for the rapid detection of dengue. *Infect Developing Countries* 2007; 1(2): 182-188.
35. Tricou V, Vu HT, Quynh NV, Nguyen CV, Tran HT, et al. Comparison of two dengue NS1 rapid tests for sensitivity, specificity and relationship to viraemia and antibody responses. *BMC Infect Dis.* 2010 May 28;10(1):142.
36. Kumarasamy V, Wahab AH, Chua SK, Hassan Z, Chem YK, et al. Evaluation of a commercial dengue NS1 antigen-capture ELISA for laboratory diagnosis of acute dengue virus infection. *J Virol Methods.* 2007 Mar;140(1-2):75-9.
37. Chaiyaratana W, Chuansumrit A, Pongthanapisith V, Tangnararatchakit K, Lertwongrath S, et al. Evaluation of dengue nonstructural protein 1 antigen strip for the rapid diagnosis of patients with dengue infection. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2009 May;64(1):83-4.
38. Dussart P, Petit L, Labeau B, Bremand L, Leduc A, et al. Evaluation of two new commercial tests for the diagnosis of acute dengue virus infection using NS1 antigen detection in human serum. *PLoS Negl Trop Dis.* 2008 Aug 20;2(8):e280.
39. Bessoff K, Delorey M, Sun W, Hunsperger E. Comparison of two commercially available dengue virus (DENV) NS1 capture enzyme-linked immunosorbent assays using a single clinical sample for diagnosis of acute DENV infection. *Clin Vaccine Immunol.* 2008 Oct;15(10):1513-8.
40. Chuansumrit A, Chaiyaratana W, Pongthanapisith V, Tangnararatchakit K, Lertwongrath S, et al. The use of dengue nonstructural protein 1 antigen for the early diagnosis during the febrile stage in patients with dengue infection. *Pediatr Infect Dis J.* 2008 Jan;27(1):43-8.
41. Ludert JE, Mosso C, Ceballos-Olvera I, del Angel RM. Use of a commercial enzyme immunoassay to monitor dengue virus replication in cultured cells. *Virol J.* 2008 Apr 25;5:51.
42. Xu T, Sampath A, Alex C, Wen D, Nanao M, Chene P, et al. Structure of the Dengue Virus Helicase/Nucleoside Triphosphatase Catalytic Domain at a Resolution of 2.4 Å. *J Virol.* 2005;79(16):10278-10288
43. Yap TL, Xu T, Chen YL, Malet H, Egloff MP, Canard B, et al. Crystal Structure of the Dengue Virus RNA-Dependent RNA Polymerase Catalytic Domain at 1.85-Ångstrom Resolution. *J Virol.* 2007;81(9):4753-4765
44. De Paula SO, Fonseca BA. Dengue: a review of the laboratory tests a clinician must know to achieve a correct diagnosis. *Braz J Infect Dis.* 2004 Dec;8(6):390-8.
45. Yamada K, Takasaki T, Nawa M, Kurane I. Virus isolation as one of the diagnostic methods for dengue virus infection. *J Clin Virol.* 2002 Apr;24(3):203-9.

-
46. McBride WJ. Evaluation of dengue NS1 test kits for the diagnosis of dengue fever. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2009 May;64(1):31-6.
 47. Shu PY, Yang CF, Kao JF, Su CL, Chang SF, et al. Application of the dengue virus NS1 antigen rapid test for on-site detection of imported dengue cases at airports. *Clin Vaccine Immunol*. 2009 Apr;16(4):589-91.
 48. Kao CL, King CC, Chao DY, Wu HL, Chang GJ. Laboratory diagnosis of dengue virus infection: current and future perspectives in clinical diagnosis and public health. *J Microbiol Immunol Infect*. 2005 Feb;38(1):5-16.
 49. Leenaars M, Hendriksen CF. Critical steps in the production of polyclonal and monoclonal antibodies: evaluation and recommendations. *ILAR J*. 2005;46(3):269-79.
 50. Rothman, A. L. Dengue: defining protective versus pathologic immunity. *J Clin Invest*. 2004;113(7):946-951.
 51. Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, et al (Eds). *Current Protocols in Molecular Biology*. New York: Greene Publishing Associates and Wiley -Interscience. 1990.
 52. Fithriyah, Sudiro TM, Dewi BE, Rukmana A, Cucanawangsih. Produksi protein non struktural I virus dengue serotipe 2 strain indonesia sebagai reagen diagnosis infeksi dengue [Tesis]. Departemen Mikrobiologi, Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia. 2008.
 53. Cardoso MJ, Tio PH. Dot enzyme immunoassay: an alternative diagnostic aid for dengue fever and dengue haemorrhagic fever. *Bulletin of the World Health Organization*. 1991;60(6):741-745.
 54. Nakane PK, Kawaoi A. Peroxidase-labeled antibody: a new method of conjugation. *J. Histochem. Cytochem*. 1974;22:1084-1091.
 55. Young PR, Hilditch PA, Bletchly C, Halloran W. An antigen capture enzyme-linked immunosorbent assay reveals high levels of the dengue virus protein NS1 in the sera of infected patients. *J Clin Microbiol*. 2000 Mar;38(3):1053-7.
 56. Nath S, Brahma A, Bhattacharyya D. Extended application of gel-permeation chromatography by spin column. *Anal Biochem*. 2003 Sep 15;320(2):199-206.
 57. Majidi J, Abdolalizadeh J, Amirkhiz M, Majidi S. Production and purification of polyclonal antibody against bovine immunoglobulins in rabbits. *African Journal of Biotechnology*. 2007 Jun 18; 6 (12): 1369-1372.

Lampiran 1. Runutan Nukleotida Gen NS1 DENV2 DS3106

Query Length : 1009

```
TAGTGGGATT TTTATCACAG ACAACGTGCA CACATGGACA GAACAATACA AATTCCAACC
AGAATCCCCT TCAAAGCTGG CTTCAGCTAT CCAGAAGGCT CATGAAGAGG GCATTTGTGG
AATCCGCTCA GTAACAAGAT TGGAGAATCT GATGTGGAAA CAAATAACAC CAGAACTGAA
TCACATTCTA TCAGAAAATG AGGTAAAAT TACTATCATG ACAGGAGACA TTAAAGGAAT
CATGCAGGCA GGAAAACGAT CCCTGCGGCC TCAACCCACT GAGCTGAAGT ACTCTTGGAA
AGCATGGGGC AAAGCGAAAA TGCTCTCCAC AGAGCTTCAT AACACACCT TTCTCATTGA
TGGCCCCGAA ACAGCAGAAT GTCCCAACAC AAACAGAGCT TGGAACTCAT TAGAAGTTGA
GGACTATGGC TTTGGAGTAT TCACCACCAA CATATGGCTG AAAC TGAAAAG AAAGGCAGGA
TGTATTTTGT GACTCAAAC TCATGTCAGC AGCCATAAAA GACAACAGGG CCGTCCACGC
CGATATGGGT TATTGGATAG AAAGCGCACT CAATGACACA TGGAAGATTG AGAAAGCCTC
TTTTATTGAA GTTAAAAGCT GCCACTGGCC AAAGTCACAC ACTCTCTGGA GTAATGGAGT
GCTAGAAAGT GAGATGATAA TTCCAAAGAA TTTTGCAGGA CCAGTGTAC AACACA ACTA
CAGACCAGGT TATCATAAC AAACGGCAGG ACCCTGGCAT CTAGGTAAGC TTGAGATGGA
CTTTGATTTT TCGGAAGGAA CCACAGTGGT AGTGACTGAG GACTGTGGAA ATAGAGGACC
CTCTTTAAGA ACAACTACTG CTTCTGGAAA ACTCATAACA GAATGGTGTCT GCCGATCTTG
CACATTACCA CCGCTAAGGT ACAGAGGTGA GGATGGATGC TGGTATGGAA TGGAAATCAG
ACCATTGAAA GAGAAAGAAG AGAACTTGGT CAACTCTTTG GTCACAGCC
```



Lampiran 2. Daftar hasil perbandingan sekuens NS1 DS3106 menggunakan *Basic Local Alignment Search Tool (BLAST)* (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>); Akses 28 Mei 2010

Sequences producing significant alignments: 1160
Sequences with query coverage 99%: 877
Maximum identities sequences (query coverage 99%) : 87% - 99%.

DQ645544.1
Dengue virus type 2 strain 1024-DHF-12/07/2001 polyprotein gene, complete
cds; Length=10671

AUTHORS Chen, H.-L., Lin, S.-R., Hsieh, S.-C., King, C.-C. and Wang, W.-K.
TITLE Evolution of dengue virus type 2 during two consecutive
Outbreaks in Taiwan in 2001-2

Score = 1808 bits (979), Expect = 0.0
Identities = 999/1009 (99%), Gaps = 0/1009 (0%)
Strand=Plus/Plus

```
Query 1 TAGTGGGATTTTATCACAGACAACGTCACACATGGACAGAACAATACAAATCCAACC 60
      |||
Sbjct 2446 TAGTGGGATTTTATCACAGACAACGTCACACATGGACAGAACAATACAAATCCAACC 2505

Query 61 AGAATCCCCTTCAAAGCTGGCTTCAGCTATCCAGAAGGCTCATGAAGAGGGCATTGTGG 120
      |||
Sbjct 2506 AGAATCCCCTTCAAAGCTGGCTTCAGCTATCCAGAAGGCTCATGAAGAGGGCATTGTGG 2565

Query 121 AATCCGCTCAGTAACAAGATTGGAGAATCTGATGTGGAACAATAACACCAGAAGTAA 180
      |||
Sbjct 2566 AATCCGCTCAGTAACAAGATTGGAGAATCTGATGTGGAACAATAACACCAGAAGTAA 2625

Query 181 TCACATTCTATCAGAAAATGAGGTAAATGACTATCATGACAGGAGACATTAAGGAAT 240
      |||
Sbjct 2626 TCACATTCTATCAGAAAATGAGGTAAATGACTATCATGACAGGAGACATTAAGGAAT 2685

Query 241 CATGCAGGCAGGAAAACGATCCCTGCGGCTCAACCCACTGAGCTGAAGTACTCTGGAA 300
      |||
Sbjct 2686 CATGCAGGCAGGAAAACGATCCCTGCGGCTCAACCCACTGAGCTGAAGTACTCTGGAA 2745

Query 301 AGCATGGGGCAAAGCGAAAATGCTCTCCACAGAGCTTCATAACCACACCTTTCTCATTGA 360
      |||
Sbjct 2746 AGCATGGGGTAAAGCGAAAATGCTCTCCACAGAGCTTCATAACCACACCTTTCTCATTGA 2805

Query 361 TGGCCCCGAAACAGCAGAATGTCCAAACAAACAGAGCTTGGAACTCATTAGAAAGTTGA 420
      |||
Sbjct 2806 TGGCCCCGAAACAGCAGAATGTCCAAACAAACAGAGCTTGGAACTCATTAGAAAGTTGA 2865

Query 421 GGACTATGGCTTTGGAGTATTCACCACCAACATATGGCTGAAACTGAAAGAAAGGCAGGA 480
      |||
Sbjct 2866 AGACTATGGCTTTGGAGTATTCACCACCAACATATGGCTGAAACTGAAAGAAAGGCAGGA 2925

Query 481 TGTATTTGTGACTCAAACTCATGTGCAGCCATAAAAGACAACAGGCGCGTCCACGC 540
      |||
Sbjct 2926 TGTATTTGTGACTCAAACTCATGTGCAGCCATAAAAGACAACAGGCGCGTCCACGC 2985

Query 541 CGATATGGGTTATTGGATAGAAAAGCGCACTCAATGACACATGGAAGATTGAGAAAGCCTC 600
      |||
Sbjct 2986 CGATATGGGTTATTGGATAGAAAAGCGCACTCAATGACACATGGAAGATTGAGAAAGCCTC 3045

Query 601 TTTTATTGAAGTAAAAGCTGCCACTGGCCAAAGTCACACACTCTCTGGAGTAATGGAGT 660
      |||
Sbjct 3046 TTTTATTGAAGTAAAAGCTGCCACTGGCCAAAGTCACACACTCTCTGGAGTAATGGAGT 3105

Query 661 GCTAGAAAAGTGAAGATGATAATTCAAAGAATTTTGCAGGACCAGTGTACACACAACACTA 720
      |||
Sbjct 3106 GCTAGAAAAGTGAAGATGATAATTCAAAGAATTTTGCAGGACCAGTGTACACACAACACTA 3165
```

```

Query 721 CAGACCAGSTTATCATACACAACGGCAGGACCCCTGGCATCTAGGTAGCTTGAGATGGA 780
         ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
Sbjct 3166 CAGACCAGGCTATCATACACAACGGCAGGACCCCTGGCACCTAGGTAGCTTGAGATGGA 3225

Query 781 CTTTGATTCTGCGAAGGAACCACAGTGGTAGTGACTGAGGACTGTGGAATAGAGGACC 840
         ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
Sbjct 3226 CTTTGATTCTGCGAAGGAACCACAGTGGTAGTGACTGAGGACTGTGGAATAGAGGACC 3285

Query 841 CTCTTTAAGAACAACACTACTGCTTCTGAAAACTCATAACAGAATGGTGCTGCCGATCTTG 900
         ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
Sbjct 3286 CTCTTTAAGAACAACACTACTGCTTCTGAAAACTCATAACAGAATGGTGCTGCCGATCTTG 3345

Query 901 CACATTACCACCGCTAAGGTACAGAGGTGAGGATGGATGCTGGTATGGAATGGAATCAG 960
         ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
Sbjct 3346 CACATTACCACCGCTAAGGTACAGAGGTGAGGATGGATGCTGGTATGGAATGGAATCAG 3405

Query 961 ACCATTGAAAGAGAAAGAGAGAAGTGGTCAACTCTTTGGTCACAGCC 1009
         ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
Sbjct 3406 GCCATTGAAAGAGAAAGAGAGAAGTGGTCAACTCTTTGGTCACAGCC 3454

```

U19778.1|DVU19778
Dengue virus type 2 nonstructural protein (NS1) gene, partial Cds;
Length=1056

AUTHORS Yang, P.-y., Kautner, I.M., Koh, C.L. and Lam, S.K.
TITLE Nucleotide and encoded amino acid sequences of the nonstructural protein NS1 gene of a Dengue-2 virus isolated in China
JOURNAL Chung Hua Wei Sheng Wu Hsueh Ho Mieh I Hsueh Tsa Chih 11 (No.1), 9-12 (1991)

Score = 1181 bits (639), Expect = 0.0
Identities = 898/1021 (87%), Gaps = 26/1021 (2%)
Strand=Plus/Plus

```

Query 2 AGTGGGATTTTTATCACAGACAACGTGCACACATGGACAGAACAATACAAATCCCAACCA 61
         ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
Sbjct 49 AGTGGGATCTTCATAACAGATAACGTGCACACATGGACAGAACAATATAACTCCCAACCA 108

Query 62 GAATCCCCTTCAAAGCTGGCTTCAGCTATCCAGBAGGCTCATGAAGAGGGCATTGTGGA 121
         ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
Sbjct 109 GAATCCCCTTCAAAGCTGGCTTCAGCCATGCGGAAGGCCATGAAGAGGGCATCTGTGGA 168

Query 122 ATCCGCTCAGTAAACAAGATTGGAGAATCTGATGTGGAACAATAACACCAGAAGTGAAT 181
         ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
Sbjct 169 ATCCGCTCAGTAAACAAGACTGGAGAATCTGATGTGGAACAATAACACCAGAATTGAAA 228

Query 182 CACATTCTATCAGAAATGAGGTAATAATGACTATCATGACAGGAGACATTAAGGAATC 241
         ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
Sbjct 229 CACATTCATCAGAAATGAACTAAAGTGAACATCATGACAGGAGACATTAAGGAATC 288

Query 242 ATGCAGGCAGGAAAACGATCCCTGCGGCCCTCAACCCACTGAGCTGAAGTACTC-TTGAA 300
         ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
Sbjct 289 ATGCAGGCAGGAAACAGATCTTTGCGGCCCCAGCCCACTGAGCTGAAGTCTCATGGGAA 348

Query 301 AGCATGGGGCAA-GCGAAATGCT-CTCCACAGAGCTTCATAACCACACCTTTCTCATT 358
         | ||| | ||| | ||| | | ||| ||| ||| ||| | ||| |||
Sbjct 349 A-CATGGCG-AAAGGGGAAAATGGTGC-CCACAGAGCCTCACAACCAGAGGTTTCTGATT 405

Query 359 GATGGCCCGAAACAGCAGAATGTCCCAACACAACAGAGCTTGGAACCTATTAGAAGTT 418
         ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
Sbjct 406 GATGGCCCTGAAACAGCAGAATGCCCAACACAACAGAGCTTGGAACCTGCT-GAAGTT 464

Query 419 GAGGACTATGG-CTTTGGAGTATTCACCACCAACATATGGCTGAAACTGAAAG-AAAGGC 476
         || |||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
Sbjct 465 GAAGACTATGGTTTGGAGTTTTACCACCAATATATGGCTAAATGAGAGAAAAG- 523

```

Query	477	AGGATGTATTTTGTGACTCAAACATCATGTCAGCAGCCA-TAAAAGACACAGGGCCGTC	535
Sbjct	524	AGGATCTGTGTTGTGACTCAAAGTCATGTCACCAGCCAGT-AAGGACACAGAGCCGTC	582
Query	536	CACGCCGATATGGGTTATTGGATAGAAAGCGCACTCAATGACACATGGAAGATTGAGAAA	595
Sbjct	583	CATGATGATATGGGTTATTGGATAGAAAGCGGCACTCAATGATACATGGAAGATGGAGAAA	642
Query	596	GCC-TCTTTTATTGAAGTTAAAAGCTGCCACTGGCCAAAGTCACACACTCTCTGGAGT-A	653
Sbjct	643	-CCTTCTTCATTGAAGTTAAAAGCTGCCACTGGCCAAAGTCACACACCCCTCTGGA-TCA	700
Query	654	ATGGAGTGCTAGAAAGTGAGATGATAATTCCAAAGAA-TTTGTCAGGACCAGTGTACAAA	712
Sbjct	701	ATGGTGGTTAGAAAGTGAGATGATAATTCCAAA-AAGTTTGTGGGCCAGTGTACAAA	759
Query	713	CACAACACTACAGACCAGGTTATCATACACAAACGGCAGGACCCT-GGCATCTAGGTAAGCT	771
Sbjct	760	CACAACACTACAGACCAGGTTATTATACGCAGACAGCAGGA-CCTAGGCATCTAGGCAAGCT	818
Query	772	TGAGATGGACTTTGATTTCTGCGAAGGAACCCACAGTGGTAGTGACTGAGGACTGTGGAAA	831
Sbjct	819	TGAGATGGACTTTGATTTCTGAGAAGGGACTACAGTGGTGGTACTGAGGACTGTGGAAA	878
Query	832	TAGAGGACCCTCTTTAAGAACAACACTACTGCTTCTGGAAAACCTATAACAGAATGGTGCTG	891
Sbjct	879	TAGAGGACCCTCTTTAAGAACAACCACTGCCTCAGGAAAACCTATAACGGAATGGTGCTG	938
Query	892	CCGATCTTGCACATTACCACCGCTAAGG-T-ACAGAGGTGAGGATGGATGCTGGTATGGA	949
Sbjct	939	CCGATCCTCCACAATACCACCCTAAGAATTA-A-AGGTGAGGATGGATGCTGGTATGGG	996
Query	950	ATGGAATCAGACCATTGAAAGAGAAAGAAGAGAACTTGGTCAAC-TCTTTGGTCACAGC	1008
Sbjct	997	ATGGAATCAGACCATTGAAAGAGAAAGAAGAGAATTTAGT-AACCTCCCTCGTCACAGC	1055
Query	1009	C 1009	
Sbjct	1056	C 1056	

RIWAYAT HIDUP



1. Nama : Paisal
2. NPM : 0806476753
3. Alamat : Kel. Cempaka Putih Barat RT.
0012 RW. 05 No. 24 A, Kec.
Cempaka Putih, Jakarta Pusat.
4. Agama : Islam
5. Tempat/Tanggal lahir : Samarinda / 7 Juli 1977
6. Riwayat Pendidikan :
 - SD : SDN Karang Bintang 2, Kalsel Lulus Tahun 1989
 - SMP : SMP Karang Bintang, Kalsel Lulus Tahun 1992
 - SMA : SMA Negeri 1 Pagatan, Kalsel Lulus Tahun 1995
 - S1 : Universitas Hasanuddin Lulus Tahun 2004
Fakultas Kedokteran
 - S2 : Universitas Indonesia Tahun 2008 - Sekarang
Program Magister Ilmu Biomedik

PRODUKSI ANTIBODI ANTI-NS1 DENGUE PADA KELINCI DAN PELABELAN DENGAN HORSERADISH PEROKSIDASE

Paisal^a, T. Beti Ernawati Dewi^a, Mirawati Sudiro^a, Fithriyah^a

^a Departemen Mikrobiologi, Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia, Jl. Pegangsaan Timur No.16 Jakarta
paisal.zain@gmail.com

Insiden penyakit dengue semakin meningkat dalam beberapa dekade terakhir. WHO memperkirakan terjadi 50 juta infeksi dengue di seluruh dunia setiap tahun. Sekitar 500.000 orang dengan demam berdarah dengue (DBD) membutuhkan perawatan di rumah sakit, sebagian besar adalah anak-anak. Sekitar 2,5% diantaranya mengalami kematian. Sampai saat ini belum ada terapi spesifik untuk infeksi dengue. Pengobatan hanya bersifat simptomatik. Walaupun demikian, pada kasus DBD dan DSS, perawatan dini dapat menurunkan angka morbiditas dan mortalitas. Di daerah endemis, gejala klinik sering tidak spesifik dan menyulitkan klinisi untuk membedakannya dengan penyakit demam lain. Untuk itu diperlukan uji laboratorium yang akurat untuk membantu menegakkan diagnosis dini infeksi dengue. Deteksi protein NS1 virus dengue telah dikembangkan sebagai alat diagnostik dini infeksi dengue. Pemeriksaan ini dapat memberikan hasil lebih dini, akurat, dan dengan cara yang lebih murah. Pada penelitian ini dikembangkan IgG anti-NS1 pada kelinci berlabel HRP yang pada akhirnya akan digunakan untuk mendeteksi protein NS1 pada serum pasien terinfeksi dengue. Antibodi hasil pelabelan dapat mendeteksi protein NS1 pada pemeriksaan dot blot dengan tingkat pengenceran 1:1600. Tetapi, hasil pelabelan tidak dapat digunakan untuk mendeteksi protein NS1 menggunakan pemeriksaan ELISA.

Kata kunci: antibodi anti-NS1 dengue, kelinci, horseradish peroksidase

PENDAHULUAN

Insiden penyakit dengue semakin meningkat dalam beberapa dekade terakhir. Sekitar 2,5 milyar penduduk, atau dua perlima dari seluruh penduduk bumi berisiko terkena penyakit dengue. WHO memperkirakan terjadi 50 juta infeksi dengue di seluruh dunia setiap tahun. Sekitar 500.000 orang dengan demam berdarah dengue (DBD) membutuhkan perawatan di rumah sakit, sebagian besar adalah anak-anak. Sekitar 2,5% diantaranya mengalami kematian. Penyakit ini telah menjadi endemis di lebih dari 100 negara di Afrika, Amerika, Asia Tenggara, dan Pasifik Barat. Negara-negara di Asia Tenggara dan Pasifik barat adalah yang paling parah terkena.^{1,2}

Di Indonesia, DBD pertama kali dilaporkan di Jakarta dan Surabaya pada tahun 1968, 15 tahun setelah kasus pertama di Filipina. Selama wabah tersebut, ditemukan 58 kasus klinis dengan jumlah kematian 24 kasus. Tahun berikutnya kasus meningkat menjadi 167 dengan kematian 40 orang.³ Sejak saat itu, insiden demam berdarah terus meningkat dan daerah yang terkena semakin meluas.⁴ Pada tahun 2008 kasus demam berdarah dengue di Indonesia mencapai 137,469 kasus

dengan angka kematian 1,187. Sedangkan pada tahun 2009, terjadi peningkatan jumlah kasus dan kematian yaitu berturut-turut 154,855 dan 1,384.⁵

Sampai saat ini, belum ditemukan vaksin dengue yang aman dan imunogenik terhadap semua serotipe virus dengue. Kendalanya adalah vaksin harus mampu mencetuskan respon imun yang bertahan lama terhadap keempat serotipe virus dengue secara simultan dan menghindari munculnya respon imun yang tidak lengkap. Respon imun parsial dapat menyebabkan penyakit dengue yang berat.⁶

Demikian pula dengan pengobatan. Hingga saat ini belum ada terapi spesifik untuk infeksi dengue. Pengobatan hanya bersifat simptomatik. Walaupun demikian, pada kasus DBD dan DSS, perawatan dini dapat menurunkan angka morbiditas dan mortalitas.^{7,8}

Infeksi virus dengue pada manusia mempunyai spektrum gejala yang luas, dari tanpa gejala (asimtomatik), demam dengue (DD), demam berdarah dengue (DBD) hingga dengue *shock syndrome* (DSS). Di daerah endemis, gejala klinik sering tidak spesifik dan menyulitkan klinisi untuk membedakannya dengan penyakit demam lain.⁹

Karena gejala klinik yang tidak spesifik dan pentingnya perawatan segera, maka dibutuhkan uji laboratorium yang akurat untuk membantu menegakkan diagnosis dini infeksi dengue. Dari beberapa uji laboratorium yang tersedia, misalnya uji yang mendeteksi virus dengue, materi genetik virus, protein non-struktural 1 (NS1) virus, dan antibodi terhadap virus, maka tiga yang pertama cocok digunakan untuk deteksi dini.¹⁰ Teknik isolasi virus dan deteksi materi genetik virus sangat berhubungan dengan fase viremia, yang terjadi pada awal infeksi, sampai hari ke-4 demam. Begitu pula dengan deteksi NS1. Kadar NS1 dapat dideteksi hingga hari ke-9 sejak mulai demam.¹¹ Lain halnya dengan deteksi antibodi terhadap virus. Antibodi IgM baru dapat dideteksi pada hari ke-3 sampai ke-5 sejak demam dan IgG pada hari ke-10 sampai 14.¹²

Setiap jenis uji laboratorium mempunyai kekurangan dan kelebihan. Isolasi virus, baru dapat diperoleh hasilnya setelah enam sampai sepuluh hari.¹¹ Deteksi materi genetik, misalnya melalui pemeriksaan *reverse transcriptase polymerase chain reaction* (RT-PCR) dapat memberikan hasil segera, tetapi membutuhkan peralatan yang mahal dan teknisi yang terlatih.¹³ Berbeda dengan deteksi protein NS1 virus. Pemeriksaan ini dapat memberikan hasil lebih dini, akurat, dan dengan cara yang lebih murah.¹⁴ Cara untuk deteksi NS1 antara lain adalah dengan *enzyme linked immunosorbent assay* (ELISA) dan *immunokromatografi*. Kedua jenis uji ini telah tersedia secara komersial.

Walaupun telah tersedia kit komersial untuk deteksi protein NS1 dengue, masih perlu dikembangkan teknik deteksi NS1 *in house* untuk kepentingan penelitian lebih lanjut. Selain itu, antibodi anti-NS1 label HRP yang diperoleh dari penelitian ini selain dapat digunakan untuk pemeriksaan ELISA, seperti halnya kit komersial, juga dapat digunakan untuk pemeriksaan dot blot. Keuntungan lain adalah deteksi NS1 *in house* relatif lebih murah.

Pada penelitian ini dilakukan produksi antibodi anti-NS1 kelinci menggunakan protein GST-NS1 hasil ekspresi gen NS1 yang diperoleh dari DENV-2 strain DS-3106 (dari pasien DBD di Jakarta tahun 2006) koleksi Departemen Mikrobiologi FKUI. Selanjutnya, antibodi anti-NS1 tersebut dilabel dengan HRP.

BAHAN DAN METODE

Bahan

Gen NS1 diperoleh dari DENV-2 strain DS-3106 koleksi Departemen Mikrobiologi FKUI yang berasal dari pasien DBD di Jakarta tahun 2006. Ekspresi protein NS1 dilakukan pada penelitian sebelumnya.¹⁵ Secara singkat, cDNA gen NS1 hasil *reverse genetic* dari strain DS-3106 diinsersikan pada plasmid pGEX-6P-1 (Amersham Pharmacia Biotech, 1997). Plasmid yang mengandung fusi GST-NS1 (pGEXD₂NS1.12) ditransformasi ke *E. coli* strain BL21. Bakteri *E. coli* digunakan untuk memproduksi protein GST-NS1. Protein NS1 yang dihasilkan adalah protein NS1 utuh yang masih menyatu dengan protein GST (GST-NS1). Purifikasi protein GST-NS1 dilakukan menggunakan *Bulk GST Purification Modules* (GE Healthcare, 2006). Pada penelitian ini digunakan 3 ekor kelinci betina jenis *New Zealand White* usia 3-4 bulan berat sekitar 2,5 kg. Horseradish Peroxidase (HRP) diperoleh dari Sigma Aldrich, Missouri.

Metode

Pemeriksaan Serum Kelinci Pre-Imunisasi dengan Dot Blot

Dot blot mengikuti metode yang telah dijelaskan sebelumnya, dengan beberapa modifikasi.¹⁶

Sebanyak 1 µl supernatan DENV-2 direkatkan ke membran nitroselulose (Hybond-C Extra, Amersham Bioscience, UK). Membran kemudian diinkubasi dengan *blocking buffer* (5% skim milk [Tropicana Slim, PT. Nutrifood Indonesia, Jakarta] dalam PBS pH 7,3) selama semalam pada suhu 4°C. Setelah proses *blocking* selesai, membran dicuci menggunakan dapar pencuci (0,01% tween-20 dalam PBS) dilanjutkan dengan menginkubasi membran dengan serum kelinci pre-imunisasi S0K01, S0K02, dan S0K03 dengan pengenceran 1:1000. Inkubasi berlangsung selama 1 jam pada suhu ruang. Membran dicuci dengan PBS/Tween dilanjutkan inkubasi dengan *goat antirabbit* IgG-biotin (1:1000), kemudian setelah pencucian ditambahkan lagi dengan streptavidin-HRP.

Setelah selesai, membran dicuci kembali dengan dapar pencuci dilanjutkan dengan menginkubasi membran dengan substrat DAB (3 mg diaminobenzidine dalam 5 mL PBS dan 5 µL H₂O₂ 30%) (Sigma Aldrich, Missouri) dan diinkubasi selama 5 menit pada kondisi gelap. Reaksi dihentikan dengan menambahkan air. Hasil pembacaan dalam bentuk kualitatif.

Kontrol negatif adalah membran nitroselulose yang tidak dilapisi antigen dan membran dengan antigen tetapi tanpa antibodi I, untuk kontrol positif adalah serum pasien positif infeksi DENV-2 berdasarkan RT-PCR.

Produksi Antibodi Anti-NS1 DENV-2 Dengue Pada Kelinci

Untuk penyuntikan pertama, antigen GST-NS1 (4µg/µl) dilarutkan dalam Freund's complete adjuvant (FCA) (Sigma Aldrich, Missouri). Sedangkan untuk booster, antigen NS1 dilarutkan dalam Freund's incomplete adjuvant (FIA) (Sigma Aldrich, Missouri). Booster dilakukan pada minggu ke-3, 5, dan 7 setelah penyuntikan pertama. Darah diambil dari arteri sentral telinga. Pengambilan darah pertama sebanyak 5 cc dilakukan pada minggu pertama. Selanjutnya pengambilan darah sebanyak 20 ~ 25 cc dilakukan pada minggu ke-6, 8, dan 9.

Setiap kelinci dilakukan penyuntikan antigen GST-NS1 dengan dosis yang berbeda, yaitu 100 µg/100 µl dan 200 µg/200 µl.

Pemeriksaan Antibodi Anti-NS1 DENV-2 Serum Kelinci dengan Metode Indirect ELISA

Metode pemeriksaan *indirect* ELISA dilakukan seperti dijelaskan sebelumnya.¹³

Sumur ELISA (Disposable Products Pty. Ltd, South Australia) dilapisi dengan 100 µl NS1 (2,3µg/µl) 1:25 dalam *coating buffer* selama semalam pada suhu 4°C. Kemudian sumur diinkubasi dengan 300 µl *blocking buffer* (5% *skim milk* dalam PBS pH 7,3) selama 1 jam pada suhu ruang. Sumur dicuci dengan 300 µl *washing buffer* (PBS/Tween 20) sebanyak 3 kali, kemudian diinkubasi dengan serum kelinci SIK01, SIK01, SIK01, SIK03, SIK03, dan SIK03 dengan pengenceran 1:50 selama 1 jam pada suhu 37°C. Setelah dicuci dengan *washing buffer*, sumur diinkubasi dengan *goat antirabbit IgG HRP* (Sigma Aldrich, Missouri) dengan pengenceran 1:5000 dalam *skim milk* 1% selama 1 jam pada suhu 37°C. Setelah dicuci ditambahkan 100 µl substrat TMB peroksidase (Kirkegaard & Perry Laboratories, Maryland) dan dibiarkan 10 menit pada suhu ruang. Kemudian reaksi dihentikan dengan penambahan 100 µl H₂SO₄ 3N. Nilai absorbansi diukur dengan *ELISA reader* (Bio-Rad Model 550, California) pada panjang gelombang 450 nm. Hasil pembacaan dalam bentuk kuantitatif.

Sebagai kontrol negatif digunakan serum kelinci preimunisasi dan sumur yang tidak dilapisi antigen.

Purifikasi Antibodi IgG dari Serum Kelinci

Untuk memurnikan IgG dari serum kelinci yang telah diimunisasi, digunakan kolom sephadex G-200 (Pharmacia, Swedia). Hasil fraksinasi sephadex di uji dengan *indirect* ELISA untuk menentukan fraksi mana yang mengandung antibodi anti-NS1.

Indirect ELISA dilakukan dengan cara yang telah dijelaskan sebelumnya. Protein yang dilapiskan adalah NS1 dalam *coating buffer* (1:25). Antibodi I adalah hasil fraksinasi dengan pengenceran 1:25 dalam *skim milk* 1%. Antibodi II adalah *goat antirabbit IgG HRP* (Sigma Aldrich, Missouri) dengan pengenceran 1:5000 dalam *skim milk* 1%.

Sebagai kontrol negatif digunakan serum kelinci preimunisasi dan sebagai kontrol positif digunakan serum kelinci positif IgG anti-NS1.

Pelabelan Antibodi IgG Kelinci dengan HRP

Konjugasi IgG dengan HRP dilakukan dengan metode periodat dengan beberapa modifikasi.¹⁷

Dilakukan aktivasi HRP dengan cara melarutkan 2 mg HRP (Sigma Aldrich, Missouri) dalam 0,5 ml DDW, lalu ditambahkan 0,2 ml NaIO₄ 0,1 M yang baru dibuat. Kemudian diinkubasi dalam suhu ruang selama 2 jam sampai warna berubah menjadi hijau, lalu dididalisis dalam 100 volume lebih natrium asetat buffer I mM (pH 4,4) pada suhu 4°C selama semalam menggunakan membran dialisis (Spectrapor, Fischer Scientific Co., Pittsburgh).

Secara bersamaan, 1 ml serum kelinci hasil purifikasi didialisis dalam 100 volume lebih natrium karbonat buffer 10 mM (pH 9,5) pada suhu 4°C selama semalam.

Konjugasi HRP dengan IgG dilakukan dengan cara mencampurkan HRP yang sudah didialisis dan ditambahkan 10 µl natrium karbonat buffer 0,2 M pH 9,5 dengan IgG yang sudah didialisis. Hasil campuran kemudian dimasukkan ke dalam tabung yang telah diselubungi dengan *aluminium foil*, lalu diinkubasi pada suhu ruang selama 2 jam. Kemudian ditambahkan dengan 100 µl NaBH₄ yang baru dibuat lalu didialisis dalam 100 volume lebih PBS pada suhu 4°C selama semalam.

Untuk menghilangkan HRP yang tidak terkonjugasi dilakukan presipitasi dengan ammonium sulfat.

Dot Blot Hasil Pelabelan Antibodi Anti-NS1 DENV-2

Metode dot blot dilakukan seperti yang telah dijelaskan sebelumnya. Hanya saja pada pemeriksaan kali ini yang dilapiskan adalah protein NS1 sebanyak 1 µl (2,3 µg) dan digunakan satu antibodi, yaitu antibodi hasil pelabelan dengan HRP. Antibodi berlabel HRP diencerkan dengan pengenceran 1:100; 1:200; 1:400; 1:800; 1:1600; 1:3200; 1:6400; 1:12800.

Kontrol negatif adalah membran nitroselulose dilapisi dengan serum pasien negatif dengue dan tanpa protein NS1.

Direct ELISA Hasil Pelabelan Antibodi Anti-NS1 DENV-2

Hasil pelabelan diperiksa dengan metode *direct* ELISA. Prosedur pemeriksaannya seperti yang telah dijelaskan sebelumnya. Antibodi yang digunakan hanya satu, yaitu antibodi anti-NS1 yang telah dilabel HRP dengan pengenceran 1:100; 1:200; 1:400; 1:800; 1:1600; 1:3200; 1:6400; 1:12800.

Kontrol negatif adalah sumur yang tidak dilapisi dengan protein NS1.

Indirect ELISA terhadap Serum Kelinci SIK03

Pemeriksaan *indirect* ELISA seperti yang telah dijelaskan sebelumnya. Pada sumur ELISA dilapiskan protein NS1 rekombinan 1:25. Antibodi I adalah serum SIK03 dengan pengenceran 1:100; 1:200; 1:400; 1:800; 1:1600; 1:3200; 1:6400; 1:12800. Antibodi II digunakan *goat antirabbit* IgG HRP.

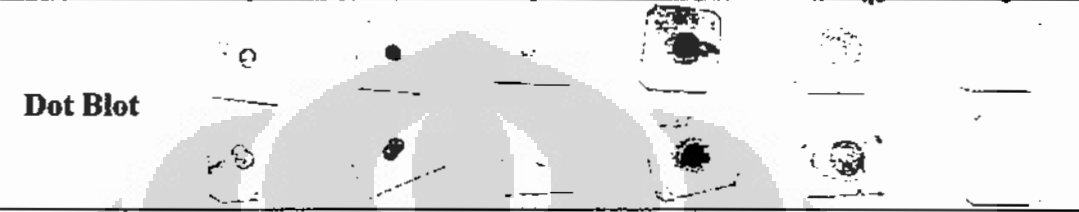
Sebagai kontrol negatif adalah antibodi I menggunakan serum kelinci preimunisasi dan tanpa antibodi I.

HASIL

Antibodi IgG Anti-NS1 Dengue pada Serum Kelinci

Sebelum imunisasi, serum ketiga kelinci (K01, K02, K03) diambil kemudian diperiksa dengan metode *dot blot*. Antigen yang dilapiskan pada membran adalah DENV-2 dari biakan sel. Hasilnya, dua kelinci negatif antibodi terhadap DENV-2 (K01 dan K03) dan satu kelinci positif (K02) (Tabel 1). K02 dikeluarkan dari penelitian.

Tabel 1. Pemeriksaan Serum Kelinci K01,K02,K03, Sebelum Imunisasi dengan Protein GST-NS1 Menggunakan Metode Dot Blot.

Antigen	DENV-2	DENV-2	DENV-2	DENV-2	DENV-2	DENV-2
Antibodi I	S0K01 (1:1000)	S0K02 (1:1000)	S0K03 (1:1000)	SP[+] (1:1000)	-	-
Antibodi II	Goat antirabbit IgG Biotin (1:1000)					Goat antihuman IgG HRP (1:1000)
Dot Blot						
Ket				K[+]	K[-]	K[-]

* SP[+]: serum manusia positif dengue; K[+]: kontrol positif; K[-]: kontrol negatif.

Setelah penyuntikan dengan antigen GST-NS1, dilakukan tiga kali pengambilan darah. Pengambilan darah I dilakukan pada minggu ke-6 sejak penyuntikan. Serum yang dihasilkan diberi kode SIK01 dan SIK03. Pengambilan darah II dan III dilakukan berturut-turut pada minggu ke ke-8 dan 9. Serum yang diperoleh diberi kode SIIK01, SIIK03, SIIK01, dan SIIK03.

Semua serum tersebut kemudian diperiksa menggunakan *indirect* ELISA untuk mengetahui apakah terbentuk antibodi anti-NS1 dengue. Dari hasil pemeriksaan, absorbansi di atas nilai kontrol negatif ($0,106 \pm 0,001$) ditemukan pada semua serum. Absorbansi tertinggi berada pada serum SIIK01 ($2,290 \pm 0,001$) dan SIIK03 ($2,266 \pm 0,005$) (Tabel 2).

Tabel 2. Pemeriksaan Antibodi Anti-NS1 Pada Serum Kelinci K01 dan K03 dengan *Indirect* ELISA

Sampel	Antibodi I	OD ₄₅₀	Ket
K01	SIK01	$1,793 \pm 0,185$	
	SIIK01	$1,903 \pm 0,042$	
	SIIK01	$2,290 \pm 0,001$	
K03	SIK03	$2,032 \pm 0,030$	
	SIIK03	$2,201 \pm 0,046$	
	SIIK03	$2,266 \pm 0,005$	
-	SK[-]	$0,106 \pm 0,001$	K[-]
-	-	$0,089 \pm 0,001$	K[-]

Ket:

* SK[-]: serum kelinci preimunisasi; K[-]: kontrol negatif.

* Antibgen digunakan NS1 rekombinan

* Antibodi II digunakan goat antirabbit IgG-HRP

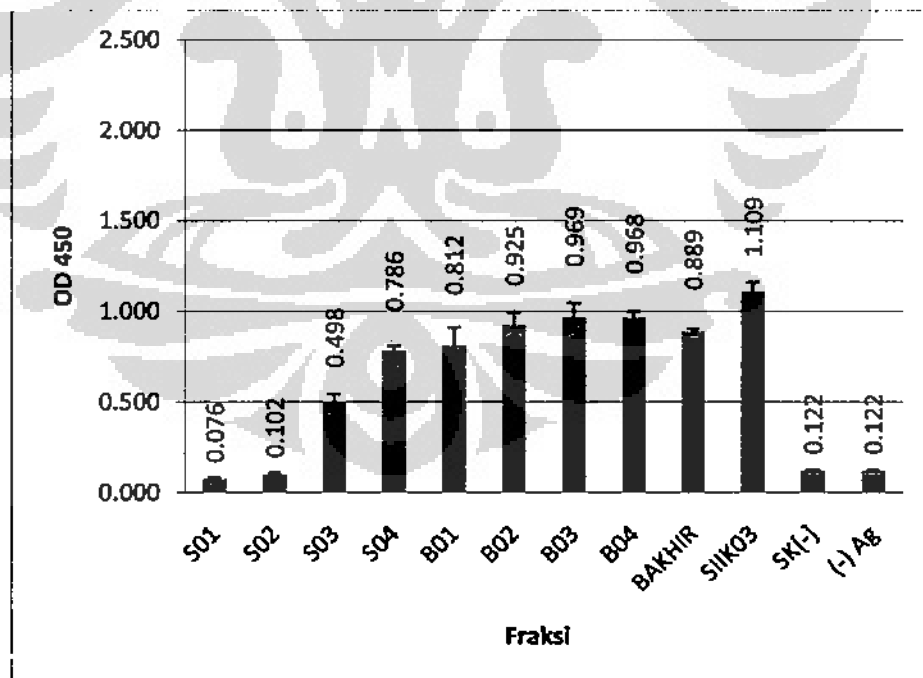
Dari hasil di atas, maka keenam serum kelinci dapat digunakan untuk proses pelabelan. Pada awalnya digunakan serum kelinci SIIK03 dan SIIK01 untuk pemeriksaan dot blot dan ELISA, serta digunakan juga pada proses pelabelan. Tetapi karena jumlahnya semakin terbatas, maka pada akhirnya digunakan serum SIIK03.

Purifikasi Antibodi IgG Serum Kelinci

Untuk memurnikan IgG dari serum kelinci yang telah diimunisasi, digunakan sephadex G-200. Sebanyak 1 ml serum SIIK03 dilewatkan pada kolom yang berisi sephadex G-200 dan ditampung setiap 5 tetes untuk satu tabung. Hasilnya adalah S01, S02, S03, dan S04. Setelah itu, kolom sephadex dibilas dengan 1 ml Na₂HPO₄, tetesan ditampung lagi setiap 5 tetes untuk satu tabung. Hasilnya diberi kode B01, B02, B03, dan B04. Kemudian, kolom dibilas lagi dengan 1 ml Na₂HPO₄, semua tetesan ditampung dalam satu tabung dan diberi kode B_{AKHIR}.

Semua hasil purifikasi diperiksa menggunakan *indirect* ELISA. Tujuan dari pemeriksaan ini adalah untuk mengetahui pada fraksi mana antibodi anti-NS1 berada.

Dari pemeriksaan terlihat bahwa absorbansi di atas kontrol negatif berada pada fraksi S03, S04, B01, B02, B03, B04, dan B_{AKHIR} (Gambar 1). Dengan pertimbangan terbatasnya kapasitas membran dialisis, maka hanya fraksi B01, B02, B03, B04 yang akan dilakukan pelabelan lebih lanjut. Gabungan dari keempat fraksi ini diberi kode B_{GAB}. Pelabelan dengan HRP dilakukan terhadap B_{GAB} dan hasilnya diberi kode SIIK03-HRP.



Gambar 1. Pemeriksaan antibodi anti-NS1 pada hasil purifikasi serum kelinci dengan Sephadex G-200 menggunakan metode *indirect* ELISA. Ket: SK(-): serum kelinci praimunisasi; (-) Ag: tanpa antigen. Biru: SIIK03 hasil fraksinasi; merah: kontrol positif; hijau: kontrol negatif.

Dot Blot Hasil Pelabelan Antibodi Anti-NS1 DENV-2

Hasil pelabelan dengan HRP diperiksa dengan metode dot blot. Tujuan pemeriksaan ini adalah untuk mengetahui apakah SIIK03HRP dapat mendeteksi protein NS1 yang direkatkan pada membran nitroselulosa.

Dari pemeriksaan diketahui bahwa SIIK03HRP dapat mendeteksi protein NS1 sampai tingkat pengenceran 1:1600 (Tabel 3).

Tabel 3. Pemeriksaan SIIK03 HRP dengan Metode Dot Blot

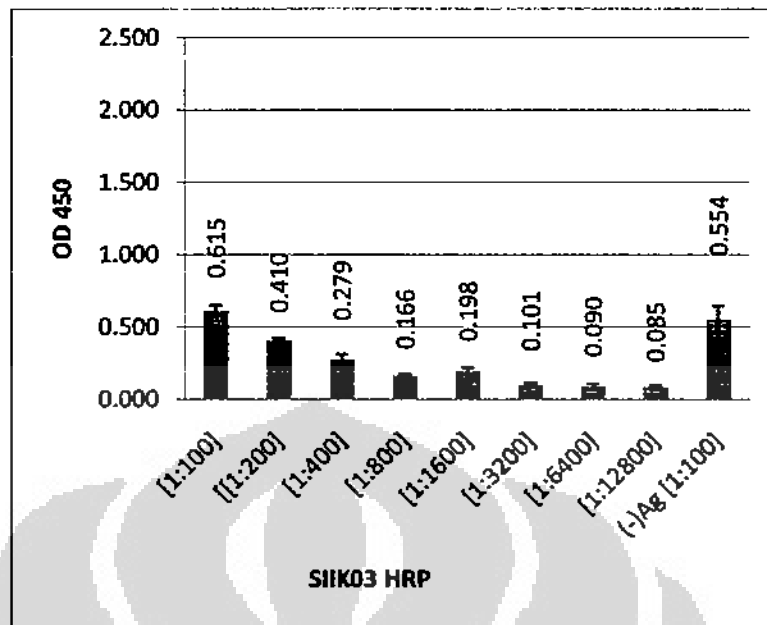
Ag	Protein NS1(2,3µg)							
Ab	SIIK03HRP							
	1:100	1:200	1:400	1:800	1:1600	1:3200	1:6400	1:12800
Dot Blot								
Ket								
Ag	SP[-]	-						
Ab	SIIK03HRP							
	1:100	1:100						
Dot Blot								
Ket	K[-]	K[-]						

* SP[-]: serum pasien negatif dengue;
 ** K[-]: kontrol negatif.

Direct ELISA Hasil Pelabelan Antibodi Anti-NS1 DENV-2

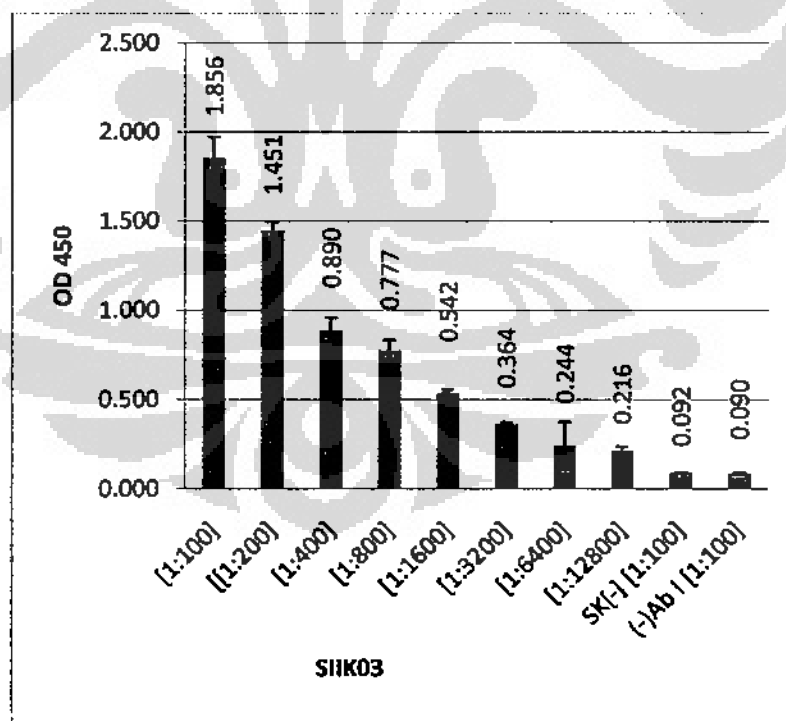
Hasil pelabelan dengan HRP juga diperiksa menggunakan metode *direct* ELISA. Tujuan pemeriksaan ini adalah untuk mengetahui apakah SIIK03 dapat mendeteksi protein NS1 yang dilapiskan pada sumur ELISA.

Hasil pemeriksaan menunjukkan bahwa absorbansi tertinggi terjadi pada pengenceran 1:100 (0,615 ± 0,035) dan terendah pada pengenceran 1:12800 (0,085 ± 0,008). Tetapi, absorbansi kontrol negatif tanpa antigen menunjukkan nilai yang tinggi yaitu 0,554 ± 0,092 (Gambar 2).



Gambar 2. Pemeriksaan kemampuan deteksi SIIK03HRP terhadap protein NS1 menggunakan metode *direct* ELISA. Ket: SK[-]: serum kelinci praimunisasi; (-)Ag: tanpa antigen. Biru: SIIK03HRP; hijau: kontrol negatif.

Indirect ELISA Serum Kelinci SIIK03



Gambar 3. Pemeriksaan antibodi anti-NS1 SIIK03 menggunakan metode *indirect* ELISA. Ket: SK[-]: serum kelinci praimunisasi; (-) Ab I: tanpa antibodi I. Biru: SIIK03; hijau: kontrol negatif.

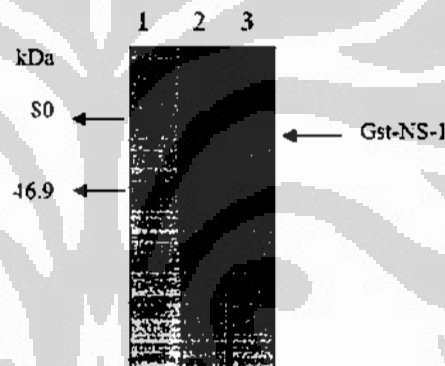
Tujuan dari pemeriksaan ini adalah untuk mengetahui kemampuan deteksi antibodi anti-NS1 SIIK03 terhadap protein NS1 rekombinan dengan metode *indirect* ELISA.

Hasil pemeriksaan memperlihatkan bahwa serum kelinci SIIK03 pada tingkat pengenceran 1:100 mempunyai absorbansi tertinggi yaitu $1,856 \pm 0,115$. Absorbansi semakin menurun dan terendah pada pengenceran 1:12800 yaitu $0,216 \pm 0,020$. Absorbansi pada semua tingkat pengenceran masih di atas absorbansi kontrol negatif yaitu $0,092 \pm 0,001$ (Gambar 3).

PEMBAHASAN

Protein NS1 adalah protein non struktural yang relatif lestari pada keempat serotipe dengue. Oleh karena itu ideal untuk dijadikan target deteksi menggunakan antibodi spesifik.

Antigen yang digunakan diperoleh dari penelitian sebelumnya.¹⁵ Antigen tersebut masih dalam bentuk GST-NS1 (berat molekul sekitar 72 kDa). Untuk mengkonfirmasi kebenaran ekspresi GST-NS1, dilakukan pemeriksaan *western blot*, hasilnya pada Gambar 4.



Gambar 4. Hasil uji western blot protein GST-NS-1 dengan antibodi monoklonal anti-GST. Ket: Lajur 1. Marka protein; 2. Elusi pellet; 3. Elusi supernatant.¹⁵

GST (Glutathione S-Transferase) merupakan protein dengan berat molekul kurang lebih 26 kDa, yang berasal dari cacing *Schistosoma japonicum*. GST umumnya digunakan untuk menghasilkan protein fusi. GST yang berfungsi sebagai “tag” ini terdiri dari 220 asam amino. GST difusikan dengan protein pada ujung amino (*N-terminus*).¹⁸

Antigen yang disuntikkan ke kelinci dalam bentuk GST-NS1 karena pada saat penyuntikan protein ini belum berhasil dipisahkan. Oleh karena itu, antibodi yang diinduksi juga terhadap GST dan NS1. Untuk menentukan apakah adanya antibodi anti-GST pada serum kelinci mempengaruhi atau tidak kemampuan deteksi antibodi anti-NS1 baik pada serum kelinci maupun serum manusia, perlu dilakukan penelitian lanjutan.

Protein GST-NS1 merupakan hasil ekspresi pada *E. coli*. Karena ekspresi pada sel prokariot, maka tidak terjadi modifikasi pasca translasi yang penting untuk pembentukan epitop konformasional. Walaupun demikian, selain epitop konformasional, NS1 mempunyai beberapa epitop linear. Chunya Puttikhunt dkk menemukan 3 epitop (NS1-1F, NS1-3F and NS1-4) linear protein NS1.¹⁹ Sedangkan Falconar dkk mengidentifikasi 4 epitop linear protein NS1 (LD2,

24A, LX1 and 24C) dan Young dkk mengidentifikasi 6 epitope linear protein NS1 (1H7.4; 2C9.4; 5H4.4; 4H3.4; 3D1.4; 3A5.4).²⁰

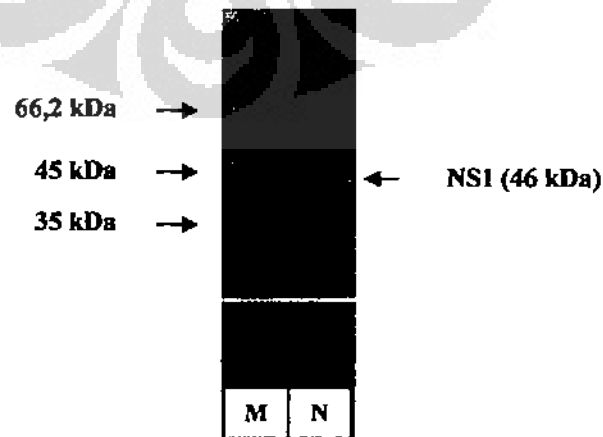
Penyuntikan antigen GST-NS1 dilakukan dengan dua dosis berbeda yaitu 100 µg untuk K01 dan 200 µg untuk K03, baik pada suntikan pertama kali maupun pada tiga suntikan *booster* selanjutnya. Dari hasil pemeriksaan *indirect* ELISA, diketahui ternyata induksi antibodi anti-NS1 terjadi pada keenam jenis serum K01 dan K03. Induksi antibodi anti-NS1 lebih tinggi pada K03 dibandingkan dengan K01 untuk serum SI ($2,032 \pm 0,030$ vs $1,793 \pm 0,185$) dan SII ($2,201 \pm 0,046$ vs $1,903 \pm 0,042$). Tetapi untuk SIII ($2,266 \pm 0,005$ vs $2,290 \pm 0,001$), nilainya hampir sama. Walaupun mempunyai nilai yang sedikit berbeda, keenam jenis serum dapat dilakukan proses pelabelan dengan HRP.

Pada penelitian ini, antibodi poliklonal yang akan dipurifikasi adalah IgG yang mempunyai berat molekul sekitar 146 kDa. Teknik purifikasi adalah dengan kolom kromatografi menggunakan sephadex G-200. Dipilihnya sephadex G-200 karena dapat membantu purifikasi protein dengan berat molekul antara 100 kDa sampai 300 kDa.²¹

Karena yang dibutuhkan adalah IgG yang spesifik terhadap protein NS1, maka pemeriksaan hasil purifikasi dilakukan dengan pemeriksaan *indirect* ELISA. Dari hasil ini terlihat bahwa antibodi anti-NS1 ditemukan pada fraksi S03, S04, B01, B02, B03, B04, dan B_{AKHIR} (Gambar 1). Akibat keterbatasan daya tampung membran dialisis, maka yang dilanjutkan ke proses pelabelan dengan HRP adalah 4 fraksi yaitu B01 – B04.

HRP merupakan salah satu enzim yang banyak digunakan dalam bidang diagnostik dan penelitian. Enzim ini dapat dipakai untuk pemeriksaan immunoblotting dan ELISA. Pemeriksaan ini dapat memberikan hasil yang dapat divisualisasi dan mempunyai sensitifitas yang baik. Selain itu, enzim yang digunakan dalam pelabelan mempunyai beberapa keuntungan dibandingkan dengan teknik fluoresens atau radioaktif. Enzim lebih stabil dan tidak mempunyai masalah keamanan seperti halnya label radioisotop. Selain itu, sensitifitasnya hampir sama dengan radioimmunoassay. Keuntungan lain adalah alat yang digunakan tidak terlalu mahal dan rumit.²²

Pelabelan terbagi menjadi 3 tahap, yaitu aktivasi HRP, konjugasi HRP dengan IgG, dan presipitasi untuk membuang sisa-sisa HRP yang tidak terkonjugasi dengan IgG.



Gambar 5. Hasil SDS PAGE Protein NS1 Rekombinan

Karena pada pertengahan penelitian protein NS1 sudah berhasil dipisahkan dari protein GST, maka protein NS1 digunakan sebagai antigen dalam pemeriksaan hasil pelabelan.

Konfirmasi kebenaran protein NS1 hasil potongan melalui pemeriksaan SDS-PAGE disajikan pada Gambar 5.

Konfirmasi protein NS1 juga dilakukan dengan menggunakan Kit ELISA NS1 (Panbio Diagnostics, Australia). Hasilnya sebesar 0,826 (kontrol positif: 1,55 dan kontrol negatif: 0,156)

IgG yang telah dilabel diperiksa menggunakan metode dot blot dan ELISA. Kedua metode ini dipilih karena masing-masing mempunyai keunggulan dan kelemahan. Metode dot blot dapat memberikan hasil berupa visualisasi pada membran tempat antigen dilapiskan, tetapi hasilnya dalam bentuk kualitatif. Sedangkan pemeriksaan ELISA memberikan hasil kuantitatif, tetapi tidak dapat menunjukkan pada bagian mana antibodi pendeteksi menempel.

Pada pemeriksaan dot blot, antibodi yang dilabel dapat mendeteksi protein NS1 di membran nitroselulose sampai tingkat pengenceran 1:1600 (Tabel 4). Hal ini berarti pelabelan berhasil dilakukan.

Antibodi kelinci berlabel HRP tidak dapat digunakan untuk mendeteksi protein NS1 menggunakan *direct* ELISA. Walaupun absorbansi pada tingkat pengenceran 1:100 cukup besar yaitu $0,615 \pm 0,035$, tetapi kontrol negatif pada tingkat pengenceran yang sama juga besar yaitu $0,554 \pm 0,092$ (tanpa antigen) (Gambar 2).

Pada pemeriksaan *indirect* ELISA menggunakan serum SIIK03 yang tidak dilabel, terlihat bahwa sampai tingkat pengenceran 1:12800, SIIK03 masih dapat mendeteksi protein NS1 yang dilapiskan pada sumur ELISA (Gambar 3). Berbeda dengan SIIK03 yang telah dilabel dengan HRP, serum SIIK03 dengan *goat antirabbit* IgG HRP komersial mempunyai nilai kontrol negatif yang rendah, yaitu $0,090 \pm 0,001$ (tanpa antigen).

Penelitian ini didanai oleh RISBIN IPTEK KEDOKTERAN.

PUSTAKA

1. WHO (World Health Organization). Dengue and dengue haemorrhagic fever [Homepage on the internet]. c2009 [updated 2009 March; cited 2009 Nov 19]. Available from <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs117/en/print.html>
2. Tsai JJ, Chan KS, Chang JS, Chang K, Lin CC, et al. Effect of serotypes on clinical manifestations of dengue fever in adults. *J Microbiol Immunol Infect.* 2009 Dec;42(6):471-8.
3. Soedarmo SP. The epidemiology, prevention and control of dengue hemorrhagic fever in Indonesia. *Gaoxiong Yi Xue Ke Xue Za Zhi.* 1994 Dec;10 Suppl:S109-12.
4. Suroso T, Achmad H, Imran A. Dengue Haemorrhagic Fever Outbreaks in Indonesia 1997-1998. *Den Bulletin.* 1998;22:45-50.

5. Departemen Kesehatan RI. Data kasus DBD per bulan di Indonesia tahun 2010, 2009, dan 2008. Jakarta. 2010.
6. Gurugama P, Garg P, Perera J, Wijewickrama A, Seneviratne SL. Dengue viral infections. *Indian J Dermatol*. 2010;55(1):68-78.
7. Koraka P, Burghoorn-Maas CP, Falconar A, Setiati TE, Djamiatun K, et al. Detection of immune-complex-dissociated nonstructural-1 antigen in patients with acute dengue virus infections. *J Clin Microbiol*. 2003 Sep;41(9):4154-9.
8. Libraty DH, Young PR, Pickering D, Endy TP, Kalayanarooj S, et al. High circulating levels of the dengue virus nonstructural protein NS1 early in dengue illness correlate with the development of dengue hemorrhagic fever. *J Infect Dis*. 2002 Oct 15;186(8):1165-8.
9. Gubler DJ. Dengue and dengue hemorrhagic fever. *Clin Microbiol Rev*. 1998 Jul;11(3):480-96.
10. Groen J, Koraka P, Velzing J, Copra C, Osterhaus AD. Evaluation of six immunoassays for detection of dengue virus-specific immunoglobulin M and G antibodies. *Clin Diagn Lab Immunol*. 2000 Nov;7(6):867-71.
11. Laphra K, Sangcharaswichai A, Chokephaibulkit K, Tiengrim S, Piriyaamsakul W, et al. Evaluation of an NS1 antigen detection for diagnosis of acute dengue infection in patients with acute febrile illness. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2008 Apr;60(4):387-91.
12. Phuong HL, Thai KT, Nga TT, Giao PT, Hung le Q, et al. Detection of dengue nonstructural 1 (NS1) protein in Vietnamese patients with fever. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2009 Apr;63(4):372-8.
13. Alcon S, Talarmin A, Debruyne M, Falconar A, Deubel V, Flamand M. Enzyme-linked immunosorbent assay specific to Dengue virus type 1 nonstructural protein NS1 reveals circulation of the antigen in the blood during the acute phase of disease in patients experiencing primary or secondary infections. *J Clin Microbiol*. 2002 Feb;40(2):376-81.
14. Halstead SB. Dengue. *Lancet*. 2007 Nov 10;370(9599):1644-52.
15. Fithriyah, Sudiro TM, Dewi BE, Rukmana A, Cucanawangsih. Produksi protein non struktural 1 virus dengue serotipe 2 strain indonesia sebagai reagen diagnosis infeksi dengue [Tesis]. Departemen Mikrobiologi, Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia. 2008.
16. Cardoso MJ, Tio PH. Dot enzyme immunoassay: an alternative diagnostic aid for dengue fever and dengue haemorrhagic fever. *Bulletin of the World Health Organization*. 1991;60(6):741-745.
17. Nakane PK, Kawaoi A. Peroxidase-labeled antibody: a new method of conjugation. *J. Histochem. Cytochem*. 1974;22:1084-1091.
18. Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, et al (Eds). *Current Protocols in Molecular Biology*. New York: Greene Publishing Associates and Wiley -Interscience. 1990.

-
19. Puttikhunt C, Kasinrerak W, Srisa-ad S, Duangchinda T, Silakate W, et al. Production of anti-dengue NS1 monoclonal antibodies by DNA immunization. *J Virol Methods*. 2003 Apr;109(1):55-61.
 20. Young PR, Hilditch PA, Bletchly C, Halloran W. An antigen capture enzyme-linked immunosorbent assay reveals high levels of the dengue virus protein NS1 in the sera of infected patients. *J Clin Microbiol*. 2000 Mar;38(3):1053-7.
 21. Nath S, Brahma A, Bhattacharyya D. Extended application of gel-permeation chromatography by spin column. *Anal Biochem*. 2003 Sep 15;320(2):199-206.
 22. Majidi J, Abdolalizadeh J, Amirkhiz M, Majidi S. Production and purification of polyclonal antibody against bovine immunoglobulins in rabbits. *African Journal of Biotechnology*. 2007 Jun 18; 6 (12): 1369-1372.

