

Analisis Imunogenisitas Virus *Dengue* Inaktif (DENV-1, DENV-2, DENV-3, DENV-4) pada Mencit (*Mus musculus*) Sebagai Kandidat Vaksin Koktail *Dengue*

Analysis of Immunogenicity on Inactivated *Dengue* Virus (DENV-1, DENV-2, DENV-3, DENV-4) in Mices (*Mus musculus*) as A Candidate *Dengue* Coctail Vaccine

¹Deka Uli Fahrodi, ²Helen Susilowati, ²Deya Karsari, ²Eryk Hendrianto,
³Sri Agus Soedjarwo, ³Mufasirin, ³Setiawan Koesdarto, ³Didik Handijanto,
³Fedik Abdul Rantam

¹ Pascasarjana Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga

²Institut Tropical Disease Universitas Airlangga

³ Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga

Kampuc C Unair, Jl. Mulyorejo Surabaya – 60115

Telp. 031-5992785, Fax. 031-5993014

Email : vetunair@telkom.net

Abstract

Dengue virus (DENV) is a single stranded RNA virus that circulates in the body of primate and causes DHF human. *Dengue* virus have four serotypes (DENV-1, DENV-2, DENV-3, DENV-4). Four *dengue* virus serotypes do have a similar, yet distinct antigenic properties. Infection only one serotype will give immunity to one serotype is concerned, but does not provide cross- immunity. This study aims to determine the immunogenicity of *dengue* virus (DENV-1, DENV-2, DENV-3 and DENV-4) inactive as a candidate *dengue* cocktail vaccine. This study used 18 mice were divided into three treatment groups, P0 immunized 0.5 cc PBS, P1 immunized with cocktail of *dengue* virus (DENV-1, DENV-2, DENV-3 and DENV-4) inactive as much as 0.5 cc TCID₅₀10⁷, P2 immunized cocktail of *dengue* virus (DENV-1, DENV-2, DENV-3 and DENV-4) inactive as much as 0.5 cc TCID₅₀10⁸. At day 0,7,14 and 21 days of 18 mice that had been treated blood drawn to determine the levels of immunoglobulin M and G with indirect elisa method. On day 28, the treatment group P1 and P2 in the challenge test with a cocktail immunized with *dengue* virus (DENV-1, DENV-2, DENV-3 and DENV-4) active 0.5 cc TCID₅₀10⁸ for the presence of viremia. The results of this study are significant differences (p<0.05) between the groups P0 (control), P1 and P2 in terms of inducing titers of immunoglobulin (IgM, IgG, IgG1a, IgG2a, and IgG2b). In the challenge test using active *dengue* virus (DENV-1, DENV-2, DENV-3 and DENV-4) TCID₅₀10⁸ in experimental animals (P1 and P2), then the PCR test followed by electrophoresis results showed the absence of viremia or viral *dengue* as evidenced by a negative PCR result.

Keywords: DENV, Imunoglobulin, *Challenge test*, vaksin *dengue*.

Pendahuluan

Indonesia merupakan daerah tropis, salah satu penyebab penyakit yang serius di daerah tropis adalah virus

Dengue. Penyakit yang ditimbulkan oleh virus *Dengue* merupakan endemis di Indonesia, dengan bentuk yang paling berbahaya berupa Demam Berdarah

Dengue (DBD) dan Sindrom Syok *Dengue* (SSD) yang biasanya bersifat fatal pada manusia, terutama pada anak-anak (Yulfi, 2006). Virus *Dengue* ditularkan melalui gigitan vektor yaitu nyamuk *Aedes aegypti* dan *Aedes albopictus* betina. Nyamuk *Ae. aegypti* merupakan vektor utama dalam penularan virus *Dengue* di Indonesia (Savage *et al.*, 1998).

Pendekatan pencegahan dan pengendalian dengan melakukan mengendalikan vektor tidaklah cukup untuk menekan angka kesakitan, diperlukan pencegahan dengan menggunakan vaksin (Soegijanto dkk., 2003). Obat maupun vaksin untuk pengobatan DBD sampai saat ini belum ditemukan (Blondine dan Retno, 2005).

Virus *Dengue* mempunyai empat jenis serotype antara lain DENV-1, DENV-2, DENV-3 dan DENV-4. Serotype DENV-3 diasumsikan menunjukkan manifestasi klinik yang berat (Lubis, 2009). Di Afrika Barat dan Asia Tenggara di temukan virus *Dengue* yang bersirkulasi pada tubuh primata dan bila ada nyamuk *Aedes* yang menggigit primata tersebut maka nyamuk *Aedes* dapat menyebarkan ke penduduk desa sekitar hutan tempat tinggal dari primata tersebut (Chen dan Vasilakis, 2011).

Dengue adalah virus RNA berantai tunggal dengan berat molekul 11 Kb. Genom tersusun dari tiga protein struktural (C, E, prM) dan tujuh protein non struktural (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B dan NS5).

Beberapa jenis vaksin telah diteliti, salah satunya dengan vaksin *whole* virus inaktif atau virus subunit. Masing-masing jenis vaksin tersebut memiliki keuntungan potensial, keduanya tidak dapat kembali pada fenotipe patogenik dan ketika dikombinasikan tidak menimbulkan interferensi/gangguan. Di sisi lain, vaksin sub unit hanya menaikkan antibodi pada bagian protein struktural dan virion normal

berdasarkan konformasi struktural. Kelemahan lain yaitu memerlukan antigen dengan konsentrasi tinggi dan *multiple doses* (Porterfield LS, 1986).

Vaksin subunit dapat digunakan sebagai vaksin *dengue* sedang menjadi perdebatan hingga saat ini. Vaksin jenis ini hanya dapat digunakan relatif untuk proteksi jangka pendek atau sebagai strategi *booster* yang baik. Sebagai catatan, vaksin inaktif yang mengandung satu serotype (DENV-2) saja ketika dilakukan *challenge* pada *tissue culture* masih menunjukkan viremia (Porterfield LS, 1986). Maka dari itu, tetravalen dari antigen terhadap keempat serotype menjadi suatu keharusan. Keistimewaan vaksin tetravalen diharapkan akan dapat meminimalisasi resiko infeksi *dengue* berat dan dapat mengurangi *mortality rate* (Liu *et al.*, 2008).

Materi dan Metode Penelitian

Penelitian ini menggunakan hewan coba sebanyak 18 ekor mencit (*Mus musculus*), strain BALB/c, umur 8-10 minggu, jenis kelamin jantan dan berat badan 20-40 gram Sebelum diberi perlakuan, semua hewan coba diadaptasikan terlebih dahulu selama satu minggu pada kondisi kandang, pakan, minum dan lingkungan yang sama. Pakan yang diberikan adalah pellet, sedangkan minum diberi air minum dalam kemasan (AMDK) yang disediakan secara *ad libitum*.

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini meliputi koktail virus inaktif (DENV-1, DENV-2, DENV3 dan DENV-4) pasase ke-52, koktail virus *dengue* aktif, PBS steril, PBS-Tween 0,05%, krimmer 4%, p-NPP, *stopping reagent*, Trizol, chloroform, propanol-2, ethanol 70%, DW, 5xRT buffer,dNTPs mix, ribonuclease inhibitor, *reverse transkriptase*, primer D2, 10x Tth buffer, primer, Tag DNA polymerase (2U/ μ l), agarose 4% yang mengandung 1 ug/ml ethidium bromide dengan marker O 174 *life technology*. Peralatan yang

digunakan untuk penelitian ini adalah *ice box*, *ice pack*, kapas, spidol permanent, *mikrotube*, *disposable syuit* 1 cc, *syuit tuberculin*, *glove*, masker, *culture cell plate* 24 well, *microplate* ELISA dan kelengkapan laboratorium lain seperti *vortex*, *ELISA reader*, *freezer*, *centrifuge*, *multi channel pipet*, pipet dropper 10 μ l, 200 μ l, dan 1000 μ l beserta tipnya, pipet hisap 5 ml dan 10 ml.

Indirect ELISA (Ig G dan Ig M)

Coating antigen dengan pengenceran 1:100 masing-masing 50 μ l per well, kemudian diinkubasi semalam pada suhu 4°C. Setelah inkubasi, dilakukan *washing* sebanyak 6 kali dengan *washing buffer* PBS-Tween 0,05%. Langkah berikutnya yaitu *blocking* dengan krimer 4% masing-masing 50 μ l per well, kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 60 menit. Setelah inkubasi, dilakukan *washing* sebanyak 6 kali. Masukkan sampel serum dengan pengenceran 1:64, masing-masing sebanyak 50 μ l per well, kemudian inkubasi pada suhu 37°C selama 60 menit. Setelah itu dilakukan *washing* sebanyak 6 kali. Tahap selanjutnya yaitu masukkan *α-rabbit Ig* (konjugate 1 : 2500) sebanyak 50 μ l per well, inkubasi lagi pada suhu 37°C selama 60 menit. *Washing* dilakukan sebanyak 6 kali sebelum dimasukkan substrat p-NPP, kemudian diinkubasi di tempat gelap selama 30 menit hingga terjadi perubahan warna. *Stopping reagent* ditambahkan dan hasilnya dibaca pada *ELISA reader* dengan panjang gelombang 405 nm.

Challenge Test

Hewan coba yang telah diinjeksi pada umur 28 hari kemudian di tantang dengan cara disuntikkan koktail virus *dengue* aktif dengan dosis 0,5cc TCID₅₀ 10⁸. Pada hari ke-35 diambil darah untuk mengetahui viremia dengan metode RT-PCR meliputi :

Ekstraksi RNA

Tahap awal ekstraksi RNA yaitu menggunakan larutan TRIZOL 250 μ l serum hewan coba mencit (balb/C) ditambahkan 190 μ l Dislaterd Water ke dalam *tube* yang berisi sel, resuspensi/kocok dengan tangan selama 15 detik, selanjutnya diinkubasi selama 5 menit pada suhu ruang. Tambahkan 200 μ l chloroform, diresuspensi selama 15 detik selanjutnya diinkubasi selama 2-3 menit di suhu ruang. Kemudian disentrifugasi 12.000 rpm 4 °C selama 15 menit dan supernatan yang berwarna jernih dipindahkan ke dalam tube baru serta tambahkan isopropyl alkohol sebanyak 500 μ l selanjutnya diresuspensi selama 15 detik dan diinkubasi selama 10 menit di suhu ruang. Tahap selanjutnya disentrifugasi selama 12.000 rpm 4 °C selama 10 menit dan buang supernatan. Pellet di cuci dengan 1 ml ethanol 75%. Selanjutnya di *vortex* dan disentrifugasi 7.500 rpm 4 °C selama 5 menit, RNA di keringkan selama 5-10 menit dan ditambahkan RNAse Free Water 10-20 μ l dan disimpan pada suhu -80 °C.

Primer

Primer yang digunakan pada penelitian ini merupakan primer yang didesain oleh Prof. Dr. Fedik A. Rantam., drh berdasarkan data dari GenBank dengan masing-masing *amplicon* 290 bp (DENV-1), 119 bp (DENV-2), 392 bp (DENV-3) dan 482 bp (DENV-4).

Amplifikasi

Reaksi RT-PCR diawali dengan pencampuran komponen (RNA primer); mix primer (TS1-TS4 @ 10 μ M) 1 μ l, 1 μ l RNA, 2 μ l dNTPmix (10 mM) dan 8 μ l DEPC, kemudian diinkubasi pada suhu 65 °C selama 5 menit. Selanjutnya dilakukan pencampuran komponen (*master reaction mix*) ; 4 μ l 5x cDNA synthesis buffer, 1 μ l DTT (0,1 M), 0,5 μ l Rnase OUT, 2 μ l DEPC dan 0,5 μ l *thermo script RT*. 8 μ l *master reaction*

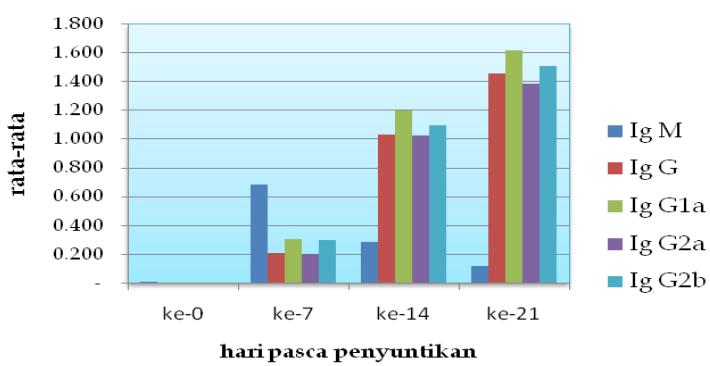
dicampurkan kedalam campuran RNA primer dan diinkubasi selama 45 menit pada suhu 50°C kemudian dinkubasi pada suhu 85°C selama 5 menit. Tambahkan 1 µl RNase H dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 20 menit. cDNA disimpan pada suhu -30°C.

Reaksi PCR diawali dengan pencampuran komponen (*master mix* (untuk 5 sampel); 79,5 µl *autoclaved distilled water*, 10 µl 10x *PCR buffer minus Mg*, 3 µl MgCl₂ (50 mM), 2 µl dNTP *mixture* (10 mM), 5 µl *mix primer* (TS1, TS2, TS3, TS4) dan 0,5 µl Tag DNA *polymerase*. Dua puluh µl *master mix* dimasukkan kedalam tiap tabung PCR yang berisi 1 µl cDNA kemudian disentrifugasi. Siklus PCR sebanyak 30 kali dimulai dengan denaturasi awal pada suhu 94°C selama 4 menit dan denaturasi akhir pada suhu 94°C selama 1 menit, *annealing* pada suhu 50°C selama 1 menit dan polimerasi awal pada suhu 72°C selama 2 menit. Siklus PCR diakhiri dengan polimerisasi akhir pada suhu 72°C selama 10 menit

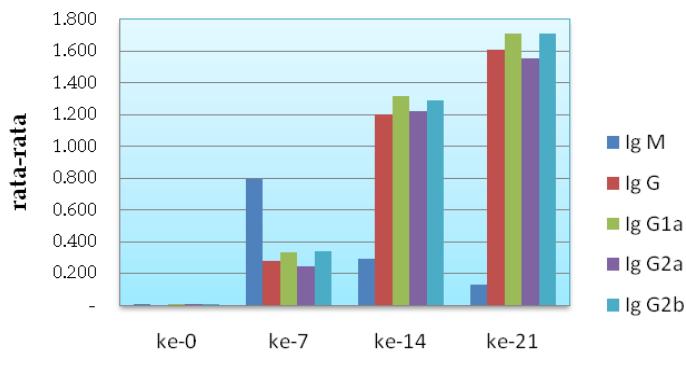
dan penurunan suhu inkubasi menjadi 4°C. hasil reaksi PCR dianalisis dengan elektroforesis gel agarosa 1,5% (150 V, 60 menit). Pita DNA yang jelas dan pada ukuran yang tepat pada gel agarosa dianggap sebagai hasil yang positif dan dipurifikasi. Sementara pita DNA yang kurang jelas pada gel agarosa tapi berada pada ukuran yang tepat, mesti dipertimbangkan lebih lanjut karena dianggap sebagai hasil yang tidak jelas (Massi dan Sabran, 2007).

Hasil dan Pembahasan

Secara keseluruhan nilai OD baik Ig M maupun Ig G serta subkelas (Ig G1a, Ig G2a dan Ig G2b) ditampilkan dalam bentuk grafik yang menggambarkan profil imunoglobulin dengan perlakuan P1 (imunisasi dengan koktail virus *dengue* inaktif TCID₅₀ 10⁷) (Gambar 1) serta perlakuan P2 (imunisasi dengan koktail virus *dengue* inaktif TCID₅₀ 10⁸) (Gambar 2).



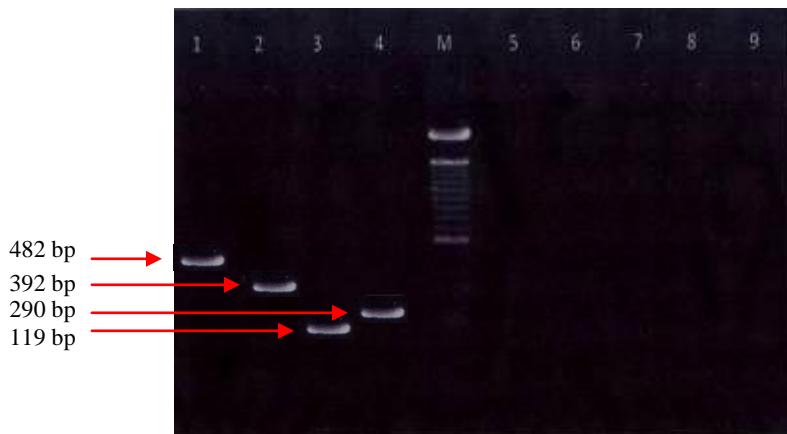
Gambar 1. Nilai rata-rata OD P1



Gambar 2. Nilai rata-rata OD P2

Hewan coba yang telah diinjeksi kemudian ditantang dengan koktail virus *dengue* aktif dengan dosis TCID₅₀ 10⁸ pada umur 28 hari untuk mengetahui

adanya viremia dengan metode RT-PCR. Hasil yang didapat setelah melakukan proses elektroforesis dapat dilihat pada Gambar 3.



Gambar 3. Hasil elektroforesis virus *Dengue* isolat ITD, Keterangan: M= Marker, lajur 1= kontrol (+) DENV-4, lajur 2= kontrol (+) DENV-3, lajur 3= kontrol (+) DENV-2, lajur 4= kontrol (+) DENV-1, lajur 5-9 = *Challenge test* dengan koktail virus *dengue* aktif (DENV-1, DENV-2, DENV-3, DENV-4) dengan dosis TCID₅₀ 10⁸.

Analisa dengan ELISA menunjukkan titer antibodi yang cukup tinggi dan bila dibandingkan dengan subkelas lainnya terdapat perbedaan yang signifikan, Ini menunjukkan bahwa yang berperan sebagai antibodi spesifik yang protektif terhadap infeksi virus *dengue* adalah Ig G1a dan Ig G2b. Hal ini dikarenakan Ig G1a merupakan komponen paling besar 65% dari IgG sedangkan Ig G2b berfungsi untuk melawan antigen polisakarida dan menjadi pertahanan yang penting bagi inang untuk melawan virus. (Moi *et al.*, 2010). Protein E yang mempunyai korelasi dengan kepekaan sel pada awal infeksi.

Pada tahap *challenge test* semua hewan percobaan secara klinis tidak menunjukkan gejala yang patognomonis terhadap adanya infeksi *dengue*. Hasil ini sesuai dengan fungsi protein E pada virus *dengue* yang berperan sebagai imun induksi yang spesifik terhadap respons imun humoral. Protein E juga menginduksi sistem imun pada mencit

melalui sel asesoris dan lebih terfokus pada proses induksi sel B untuk memproduksi antibodi humorai. Data ini didukung dengan tidak adanya viremia.

Pada hewan percobaan mencit respons imun yang timbul akibat vaksinasi dengan koktail virus *dengue* inaktif (DENV-1, DENV-2, DENV-3 dan DENV-4) menunjukkan titer antibodi yang cukup tinggi dan ditemukan beberapa klas dan subklas imunoglobulin. Kelas imunoglobulin yang mempunyai titer antibodi tinggi adalah IgG1a dan IgG2b. Walaupun tidak semua individu menghasilkan titer antibodi yang sama dan dengan melihat sifat protein yang dimiliki oleh virus *dengue* terutama protein E yang bersifat imunogen, maka hasil ini sangat sesuai untuk menghambat transmisi virus *dengue* akibat *antibody-dependent enhancement*. Respons imun yang berawal dari fragmen antigen yang diekspresikan oleh MHC II dari sel asesoris atau langsung pada sel B sehingga antibodi yang terinduksi oleh

virus *dengue* mempunyai titer tinggi. Menurut Ferguson *et al.*, (1999), hal ini karena setiap individu mempunyai respons imun yang berbeda, akibat dari variabel yang bermacam-macam tingkatannya.

Kesimpulan

Virus *dengue* inaktif (DENV-1, DENV-2, DENV-3 dan DENV-4) TCID₅₀10⁷ dan TCID₅₀10⁸ dapat meningkatkan respons imun humoral pada mencit (*Mus musculus*).

Koktail virus *dengue* (DENV-1, DENV-2, DENV-3 dan DENV-4) inaktif dapat menginduksi antibodi immunoglobulin M dan immunoglobulin G yang tinggi pada hewan coba berdasarkan nilai OD, dimana titer paling tinggi pada Ig G1a dan Ig G2b.

Pada *Challenge test* menggunakan koktail virus *dengue* aktif (DENV-1, DENV-2, DENV-3 dan DENV-4) TCID₅₀ 10⁸ pada hewan coba (P1 dan P2), kemudian dengan uji RT-PCR menunjukkan hasil tidak adanya viremia atau virus *dengue* yang dibuktikan dengan hasil PCR negative.

Daftar Pustaka

Blondine and A.Y. Retno. 2005. The Efectivity of Vectobac and Mesocyclopsasperacornis Predator as a Biological ControlAgent of *Aedes aegypti* Larvae in Waterjars, J. Kedokteran Yarsi;13.

Chen, R. and N. Vasilakis. 2011. *Dengue*- Quo tu et quo vadis. Viruses. 3: 1562-1608.

Liu CC, Lei and Yeh. 2008. Immunopathogenesis of dengue virus infection. J Biomed Sci 8:377-388.

Lubis, M. 2009. Frekuensi virus *Dengue* Serotype 4 dari Serum Penderita DD/DBD di Rumah Sakit Kota Medan Menggunakan RT-PCR [Tesis]. Universitas Sumatera Utara.

Porterfield LS, 1986. Antibody-dependent enhancement of viral infectivity. Advances in Virus Research 31 : 335-355.

Savage, H.M., C.L. Fritz, D. Rutstein, A. Yolwa, V. Vorndam, and D.J. Gubler. 1998. Epidemic of *Dengue-4* Virus in Yap State, Federated States of Micronesia, and Implication of *Aedes hensili* As an Epidemic Vector. Am. J. Tropical Medicine and Hygiene. 58(4): 519-524.

Soegijanto, S., F.A. Rantam, Soetjipto, K. Sudiana dan Y. Priyatna. 2003. Uji Coba Vaksin *Dengue* Rekombinan pada Hewan Coba Mencit, Tikus, Kelinci dan Monyet. Sari Pediatri. 5(2): 64-71.

Yulfi, H. 2006. Persistency of Transovarian *Dengue* Virus in *Aedes aegypti*. http://library_usu.ac.id/download/fk/pdf.[Diakses 29 November 2012].