

LAPORAN AKHIR PENELITIAN

Status Kekebalan dan Efikasi Protektif dari Vaksin
Subunit Protein Rekombinan NS 1-Dengue 1 (Strain
Indonesia, Bekasi 2003915846) pada Mencit (Balb/c)



Whinie Lestari & Tim

KEMENTERIAN KESEHATAN RI, JAKARTA

BADAN PENELITIAN DAN PENGEMBANGAN KESEHATAN

PUSAT BIOMEDIS DAN TEKNOLOGI DASAR KESEHATAN

2012

LAPORAN AKHIR PENELITIAN

Status Kekebalan dan Efikasi Protektif dari Vaksin
Subunit Protein Rekombinan NS 1-Dengue 1 (Strain
Indonesia, Bekasi 2003915846) pada Mencit (Balb/c)



Whinie Lestari & Tim

KEMENTERIAN KESEHATAN RI, JAKARTA

BADAN PENELITIAN DAN PENGEMBANGAN KESEHATAN

PUSAT BIOMEDIS DAN TEKNOLOGI DASAR KESEHATAN

2012

SUSUNAN TIM PENELITIAN

No	NAMA	KEAHLIAN/ KESARJANAAN	KEDUDUKAN DALAM TIM	URAIAN TUGAS
1	Ka Puslitbang Biomedis & Teknologi Dasar Kesehatan		Narasumber	Memberikan bimbingan kerjasama dan kegiatan penelitian
2	Prof. Dr. Agus Sjarurahman Ph.D (Mikrobiologi FK UI)	Virologi Dengue	Narasumber	Memberikan bimbingan untuk evaluasi status kekebalan pasca vaksinasi
3	Dr. Tjahjani Mirawati Soediro Ph.D (Mikrobiologi FK UI)	Virologi	Narasumber	Memberikan bimbingan di bidang vaksinasi dengan protein rekombinan NS1
4	Dr. drh. Joko Pamungkas, MSc (Pusat Studi Primata, Bogor)		Narasumber	Memberikan bimbingan untuk penanganan hewan coba dan uji challenge
5	Dr. C.S. Whinie Lestari M.Kes	Biomedik	Ketua Pelaksana/ Peneliti Muda	Bertanggung jawab atas semua kegiatan penelitian
6	Drh. Rita Marleta Dewi M.Kes	Biomedik	Peneliti Madya	Bertanggung jawab atas vaksinasi hewan coba
7	Dr. Drh. Diah Iskandriati	Animal model	Peneliti Madya	Bertanggung jawab atas uji challenge
8	Drh. Imelda, M.Sc (Pusat Studi Primata Bogor)	Animal model	Peneliti	Bertanggung jawab atas pemeliharaan hewan coba
9	Dr. Reni Herman M.Biomed	Virologi	Peneliti Pertama	Bertanggung jawab atas penentuan titer virus untuk uji challenge
10	Budi Nuratmi BSc	Biomedik	Peneliti Madya	Bertanggung jawab untuk evaluasi status kekebalan
11	Siti Mariyani AMAK	Analisis	Pembantu Peneliti	Membantu pelaksanaan pemeriksaan ELISA
12	Driya Shintia Dewi Aditianti, S.Si		Pembantu Peneliti	Membantu pelaksanaan pemeriksaan uji Complement Fixation test.
13	Anisa Yunita, AMAK		Pembantu Peneliti	Membantu pelaksanaan vaksinasi
14	Teti Fitriani, AMD		Pembantu Peneliti	Membantu pelaksanaan uji challenge
15	Masnur Siringo-ringo		Pembantu Peneliti	Membantu mengolah data
16	Imu Rahman	SLTA	Pembantu Peneliti	Bertanggung jawab atas administrasi penelitian
17	Hambrah Sri Wuryani	SLTA	Pembantu Peneliti	Bertanggung jawab atas administrasi penelitian



KEMENTERIAN KESEHATAN RI

BADAN PENELITIAN DAN PENGEMBANGAN KESEHATAN

PUSAT BIOMEDIS DAN TEKNOLOGI DASAR KESEHATAN

Jalan Percetakan Negara No. 23 Jakarta 10560
Kotak Pos 1226 Jakarta 10012

Telepon (021) 42881758, 42881763, 42881762, 42881745
Fax (021) 42881754

KEPUTUSAN

KEPALA PUSAT BIOMEDIS DAN TEKNOLOGI DASAR KESEHATAN

NOMOR: HK.03.05/III/750/2012

TENTANG

PEMBENTUKAN TIM PELAKSANA PENELITIAN TAHUN 2012

KEPALA PUSAT BIOMEDIS DAN TEKNOLOGI DASAR KESEHATAN

MENIMBANG

- : a. bahwa untuk melaksanakan kegiatan penelitian pada Pusat Biomedis dan Teknologi Dasar Kesehatan, perlu ditunjuk Tim Pelaksana Penelitian Tahun 2012;
- b. bahwa berdasarkan pertimbangan huruf a tersebut diatas, maka dipandang perlu menetapkan Keputusan Kepala Pusat Biomedis dan Teknologi Dasar Kesehatan tentang Pembentukan Tim Pelaksana Penelitian Tahun 2012 sejumlah tujuh belas penelitian;

MENGINGAT

- : 1. Undang-Undang Nomor 23 Tahun 1992 tentang Kesehatan (Lembaran Negara Republik Indonesia tahun 1992 Nomor 100, Tambahan Lembaran Negara Republik Indonesia Nomor 3495);
- 2. Undang-undang Nomor 14 Tahun 2001 tentang Paten (Lembaran Negara Republik Indonesia Tahun 2002 Nomor 109, Tambahan Lembaran negara Republik Indonesia Nomor 4130);
- 3. Peraturan Pemerintah RI No. 39 Tahun 1995 tentang Penelitian dan Pengembangan Kesehatan (Lembaran Negara Tahun 1995 Nomor 67, Tambahan Lembaran Negara Nomor 3609);
- 4. Peraturan Pemerintah Nomor 20 Tahun 2005 tentang Alih Tehnologi Kekayaan Intelektual serta hasil Penelitian dan Pengembangan oleh Perguruan Tinggi dan Lembaga Penelitian dan Pengembangan (Lembaran Negara Tahun 2005 Nomor 43, Tambahan Lembaran Negara Nomor 4497);
- 5. Keputusan Menteri Kesehatan Nomor 791/Menkes/SK/VI/1999 tentang Koordinasi Penyelenggaraan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan;
- 6. Keputusan Menteri Kesehatan Nomor 1179A/Menkes/SK/X/1999 tentang Kebijakan Nasional Penelitian dan Pengembangan Kesehatan;
Peraturan Presiden Nomor 47 Tahun 2009 tentang Pembentukan dan Organisasi Kementerian Negara.
- 7. Peraturan Menteri Kesehatan No. 1144/Menkes/Per/VIII/2010 tentang Organisasi dan Tata Kerja Kementerian Kesehatan;
- 8. Keputusan Menteri Kesehatan Republik Indonesia No.HK.03.05/4/11675/2011 tanggal 30 Desember 2011 tentang Penetapan Kuasa Pengguna Anggaran, Pejabat Pembuat Komitmen, Pejabat Penguji dan Penandatanganan SPM, Bendahara Pengeluaran dan Bendahara Penerimaan pada Pusat Biomedis dan Teknologi Dasar Kesehatan di Jakarta tahun anggaran 2012;

MEMPERHATIKAN

- : 1. Daftar Isian Pelaksanaan Anggaran (DIPA) Pusat Biomedis dan Teknologi Dasar Kesehatan tahun 2012 dengan No.0683/024-11.1.01/00/2012, tanggal 9 Desember 2011;



KEMENTERIAN KESEHATAN RI

BADAN PENELITIAN DAN PENGEMBANGAN KESEHATAN

PUSAT BIOMEDIS DAN TEKNOLOGI DASAR KESEHATAN

Jalan Percetakan Negara No. 23 Jakarta 10560
Kotak Pos 1226 Jakarta 10012

Telepon (021) 42881758, 42881763, 42881762, 42881745
Fax (021) 42881754

MEMUTUSKAN

MENETAPKAN

KESATU

- 1) Membentuk Tim Pelaksana Penelitian Biomedis dan Teknologi Dasar Kesehatan Tahun 2012 sebagaimana tercantum dalam lampiran keputusan ini;
- 2) Kepada Tim Pelaksana Penelitian pada Pusat Biomedis dan Teknologi Dasar Kesehatan, Badan Litbang Kesehatan Tahun Anggaran 2012, dapat diberikan honorarium sebagaimana tersebut dalam lampiran 2 Keputusan ini;

KEDUA

- 1) Tim Pelaksana Penelitian Tahun 2012 mempunyai tugas sebagai berikut:
 - 1) Melaksanakan Penelitian pada Pusat Biomedis dan Teknologi Dasar Kesehatan Tahun 2012, dengan susunan Tim seperti pada lampiran surat keputusan ini;
 - 2) Menyerahkan Laporan Kemajuan Penelitian, Laporan Pelaksanaan Penelitian dan Laporan Akhir Penelitian kepada Kepala Pusat Biomedis dan Teknologi Dasar Kesehatan.

KETIGA

- 1) Dalam melaksanakan tugasnya, Tim bertanggungjawab kepada Kepala Pusat Biomedis dan Teknologi Dasar Kesehatan serta wajib menyampaikan laporan akhir penelitian sebagai pertanggungjawaban kegiatan;

KEEMPAT

- 1) Biaya pelaksanaan kegiatan serta honor Tim Pelaksana Penelitian Tahun 2012 dibebankan pada anggaran DIPA Pusat Biomedis dan Teknologi Dasar Kesehatan Tahun 2012;

KELIMA

- 1) Keputusan ini mulai berlaku sejak bulan Januari sampai dengan Desember 2012 dengan ketentuan apabila dikemudian hari ternyata terdapat kekeliruan dalam penetapan ini akan diadakan perbaikan dan perubahan sebagaimana mestinya.

Ditetapkan di : Jakarta
Pada tanggal : 6 Februari 2012



Drs. Ondin Dwi Sampurno, M.Si., Apt
NIP. 19621119 198803 100 1

Tembusan Yth:

1. Sekretaris Jenderal Kemenkes RI;
2. Inspektur Jenderal Kemenkes RI;
3. Ketua Badan Pemeriksa Keuangan;
4. Kepala Badan Pengawasan Keuangan dan Pembangunan;
5. Kepala Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan;
6. Sekretaris Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan;
7. Kanwil Ditjen Anggaran Kemenkeu RI DKI Jakarta;
8. Para Kepala Pusat di Lingkungan Badan Litbang Kesehatan;
9. Kepala Bagian Tata Usaha Pusat Biomedis dan Teknologi Dasar Kesehatan;
10. Kepala Bidang Biomedis, Pusat Biomedis dan Teknologi Dasar Kesehatan;
11. Kepala Bidang Teknologi Dasar Kesehatan, Pusat Biomedis dan Teknologi Dasar Kesehatan;
12. Bendaharawan Pengeluaran Pusat Biomedis dan Teknologi Dasar Kesehatan;
13. Masing-masing yang bersangkutan untuk dilaksanakan.



KEMENTERIAN KESEHATAN RI

BADAN PENELITIAN DAN PENGEMBANGAN KESEHATAN

PUSAT BIOMEDIS DAN TEKNOLOGI DASAR KESEHATAN

Jalan Percetakan Negara No. 23 Jakarta 10560
Kotak Pos 1226 Jakarta 10012

Telepon (021) 42881758, 42881763, 42881762, 42881745
Fax (021) 42881754

Lampiran 1
Keputusan Kepala Pusat Biomedis dan Teknologi Dasar Kesehatan

Nomor : HK.03.05/III/750/2012

Tanggal : 6 Februari 2012

SUSUNAN TIM PELAKSANA PENELITIAN TAHUN 2012

STATUS KEKEBALAN DAN EFIKASI PROTEKTIF DARI VAKSIN SUB UNIT PROTEIN REKOMBINAN NS-1 DENGUE (STRAIN INDONESIA, BEKASI 2003915846) PADA MENCIT (BALB/C)

- | | | |
|-----|-------------------------------|---------------------------------|
| 1. | dr. CS. Whinie Lestari, M.Kes | : Peneliti Muda/Ketua Pelaksana |
| 2. | drh. Rita Marleta Dewi, M.Kes | : Peneliti Madya |
| 3. | Dr. drh. Diah Iskandriati | : Peneliti Madya |
| 4. | Budi Nuratmi, B.Sc | : Peneliti Madya |
| 5. | dr. Reni Herman, M.Biomed | : Peneliti Pertama |
| 6. | drh. Imelda, M.Sc | : Peneliti Non Fungsional |
| 7. | Siti Mariyani, AMAK | : Pembantu Peneliti |
| 8. | Driya Syinta Aditinati, S.Si | : Pembantu Peneliti |
| 9. | Anisa Yunita, AMAK | : Pembantu Peneliti |
| 10. | Teti Fitriani, AMD | : Pembantu Peneliti |
| 11. | Masnur Siringo-ringo | : Pembantu Peneliti |
| 12. | Budi Rahayu | : Pembantu Peneliti |
| 13. | Hambrah Sri Wuryani | : Pembantu Peneliti |



Drs. Ondri Dwi Sampurno, M.Si., Apt
NIP 19621119 198803 100 1



KEMENTERIAN KESEHATAN RI
BADAN PENELITIAN DAN PENGEMBANGAN KESEHATAN
PUSAT BIOMEDIS DAN TEKNOLOGI DASAR KESEHATAN

Jalan Percetakan Negara No. 23 Jakarta 10560
Kotak Pos 1226 Jakarta 10012

Telepon (021) 42881758, 42881763, 42881762, 42881745
Fax (021) 42881754

Lampiran 2
Keputusan Kepala Pusat Biomedis dan Teknologi
Dasar Kesehatan

Nomor : HK.03.05/III/750/2012
Tanggal : 6 Februari 2012

**JUDUL PENELITIAN : STATUS KEKEBALAN DAN EFIKASI PROTEKTIF DARI VAKSIN
SUB UNIT PROTEIN REKOMBINAN NS-1 DENGUE (STRAIN
INDONESIA, BEKASI 2003915846) PADA MENCIT (BALB/C)**

JUMLAH HONOR TIM PELAKSANA PENELITIAN TAHUN 2012

- | | | |
|----------------------------|---|---|
| 1. Peneliti muda | : | Jumlah honor yang diterima per-jam, per-minggu =Rp. 40.000
sebesar |
| 2. Peneliti Madya | : | Jumlah honor yang diterima per-jam, per-minggu =Rp. 50.000
sebesar |
| 3. Peneliti Pertama | : | Jumlah honor yang diterima per-jam, per-minggu =Rp. 35.000
sebesar |
| 4. Peneliti Non Fungsional | : | Jumlah honor yang diterima per-jam, per-minggu =Rp. 30.000
sebesar |
| 5. Pembantu Peneliti | : | Jumlah honor yang diterima per-jam, per-minggu =Rp. 20.000
sebesar |

Kepala,

Drs. Ondri Dwi Sampurno, M.Si., Apt
NIP 19621119 198803 100 1

RINGKASAN EKSEKUTIF

Penyakit demam berdarah dengue (DBD) sampai saat ini masih merupakan masalah kesehatan masyarakat di Indonesia dan merupakan salah satu program prioritas utama di bidang kesehatan. Hingga saat ini belum ada vaksin dengue yang tersedia di pasaran, yang ada hanya kandidat vaksin dengue sehingga masih dibutuhkan pengembangan vaksin yang aman dan halal.

Studi awal pengembangan vaksin menggunakan virus DEN inaktif menghasilkan hilangnya imunogenisitas virus sebagian karena proses inaktivasi. Selanjutnya dikembangkan live attenuated vaccine yang dapat memicu kekebalan protektif tinggi, namun menimbulkan komplikasi klinis yang tidak diharapkan. Sehingga pengembangan vaksin saat ini ke arah sub unit protein rekombinan dan DNA rekombinan.

Tahun 2009 dan 2010 telah dilakukan penelitian pengembangan vaksin Dengue dengan teknologi sub unit protein rekombinan yang berasal dari protein Non Struktural 1 virus DEN 1 strain Indonesia (Bekasi 2003915846) dengan sistem ekspresi di *Pichia pastoris*. Telah dihasilkan construct dari plasmid pPICZ alpha B di *E.coli* Top 10F yang mengekspresikan protein rekombinan DEN-1-NS1. Kemudian telah diproduksi protein rekombinan DEN-1-NS1 dengan berat molekul 120 kDa yang menggunakan sistem ekspresi sekresi dari sel inang *Pichia pastoris*. Protein rekombinan yang dihasilkan telah diverifikasi dengan PCR, sekuensing, SDS PAGE, ELISA dan Western Blott dan masih menunjukkan respon imunogenisitas seperti bentuk wild typenya. Penelitian lanjutan bertujuan untuk mengetahui status kekebalan dan efikasi protektif subunit vaksin rekombinan NS1-DEN-1 pada hewan coba mencit Balb/c.

Hasil status kekebalan pada mencit Balb/c yang telah divaksinasi dengan protein rekombinan rNS1, diberi adjuvan Freund dan aluminium hidroksida dengan rata-rata titer antibodi (OD 450 nm) berturut-turut sebagai berikut 0,125; 0,292; 0,301. Pemberian vaksinasi dilakukan sebanyak 3 kali dengan interval 1 minggu dan dosis protein rekombinan rNS1 50 ug/ml. Hasil ini menunjukkan telah terjadi peningkatan titer antibodi dibandingkan dengan kelompok kontrol yang divaksin dengan PBS (titer antibodi: 0,062) dan plasmid pPICZαB (titer antibodi: 0,057).

Rata- rata titer antibodi lebih tinggi pada pemberian vaksin dengan adjuvant dibandingkan tanpa adjuvant. Pemberian vaksin protein rekombinan dengan adjuvant Freund hasilnya lebih tinggi dari pada adjuvant Aluminium hidroksida karena adjuvant Freund merupakan adjuvant yang sesuai untuk mencit Balb/c. Namun pemberian dengan adjuvant Alum juga menunjukkan titer antibodi yang lebih tinggi dibandingkan vaksin yang tanpa adjuvant dan adjuvant alum merupakan adjuvant yang sesuai untuk manusia. Sehingga dapat dipertimbangkan untuk pemberian vaksin protein rekombinan rNS1 juga dapat diberikan tambahan adjuvant Alum untuk menghasilkan respon kekebalan yang lebih optimal.

Hasil uji challenge tidak ditemukan kelumpuhan dan kematian pada seluruh kelompok mencit Balb/C. Hasil ini menunjukkan bahwa mencit Balb/c kurang susceptible jika dilakukan pada mencit umur diatas 6 minggu. Sehingga kekebalan protektif diukur dengan titer antibodi pasca uji challenge. Rata-rata titer antibodi pasca uji challenge dengan wild type virusnya menunjukkan kenaikan yang lebih tinggi dibandingkan dengan pasca vaksin yaitu berturut-turut dengan vaksin protein rekombinan rNS1, dengan adjuvant Alum dan Freund sebagai berikut: 0,164; 0,312; 0,506. Hasil ini menunjukkan bahwa vaksinasi dengan protein rekombinan dapat memberikan respon kekebalan terhadap infeksi virus Dengue liar.

ABSTRAK

Virus dengue yang ditularkan melalui gigitan nyamuk dapat menyebabkan penyakit demam dengue/demam berdarah dengue/*dengue shock syndrome*, sehingga menjadi prioritas utama untuk pengendaliannya. Vaksinasi merupakan salah satu alternatif strategi pengendalian yang efektif. Beberapa penelitian telah mengidentifikasi bahwa protein non-struktural 1 (NS1) merupakan antigen yang menjanjikan untuk pengembangan vaksin dengue. Penelitian ini menggunakan protein rekombinan NS1 DEN-1 strain Indonesia yang diekspresikan pada *Pichia pastoris*. Vaksinasi dilakukan pada mencit Balb/c secara *intramuscular*, kemudian dilanjutkan dengan uji *challenge* dengan virus DEN-1 secara *intravena*. Hasilnya menunjukkan bahwa vaksin subunit protein rekombinan NS1 DEN-1 dapat memberikan reaksi imunogenisitas dan respon imun terhadap infeksi virus Dengue liar.

DAFTAR ISI

	Hal.
RINGKASAN EKSEKUTIF	1
SUSUNAN TIM PENELITI	
I. LATAR BELAKANG	2
RUMUSAN MASALAH	6
II. TUJUAN	
1. Tujuan Umum	8
2. Tujuan Khusus	8
III. MANFAAT	8
IV. METODE	9
1. Kerangka Pikir	9
2. Tempat dan Waktu Penelitian	9
3. Desain Penelitian	10
4. Jenis Penelitian	10
5. Populasi dan Sampel	10
Populasi	10
Sampel	10
6. Uji Laboratorium	10
V. HASIL PENELITIAN	17
DAFTAR KEPUSTAKAAN	21
LAMPIRAN	
▪ Persetujuan Etik Komisi Etik Penelitian Kesehatan Badan Litbangkes	

DAFTAR GAMBAR

Gambar 1. Protein structural dan non structural virus Dengue (Whitehead et al, 2007).....	4
Gambar 2. Struktur virus dengue (Zang W et al, 2003)	5
Gambar 3. Anestesi mencit Balb/c secara intra peritoneal dengan Ketamin dan Xylazine sebelum pengambilan darah.....	17
Gambar 4. Pengambilan darah sinus retro orbital	18
Gambar 5. Uji challenge dengan injeksi intravena pada vena cauda dengan konsentrasi titer virus Dengue serotype 1 sebesar $7,5 \times 10^5$ PFU.....	19

DAFTAR TABEL

Tabel 1. Distribusi serotipe Dengue pada tersangka penderita DBD anak & dewasa di RS DKI (Th 2009)	5
---	---

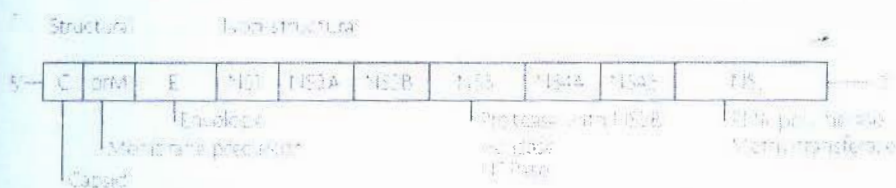
DAFTAR GRAFIK

Grafik 1. Rata-rata titer Antibodi pasca vaksinasi untuk menunjukkan status kekebalan terhadap Dengue serotipe 1 dengan metode ELISA.....	19
Grafik 2. Pengukuran ELISA : rata-rata titer antibodi terhadap virus Dengue pasca uji Challenge.....	20

1. LATAR BELAKANG

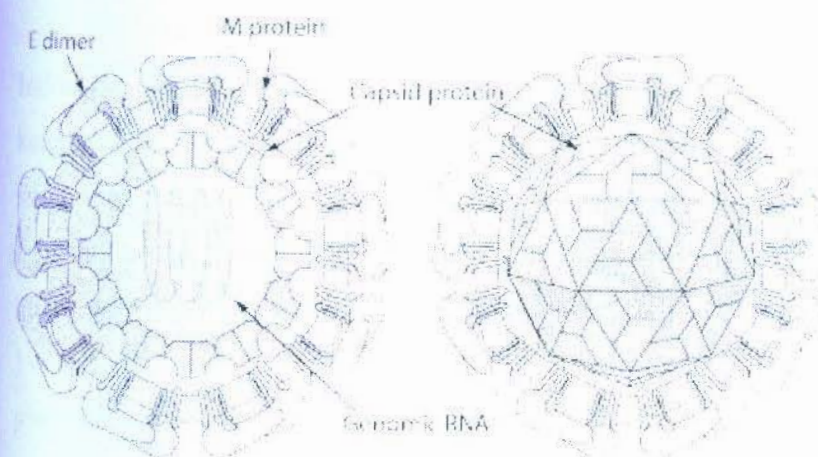
Penyakit demam berdarah dengue (DBD) sampai saat ini masih merupakan masalah kesehatan masyarakat di Indonesia dan merupakan salah satu program prioritas di bidang kesehatan. Sampai saat ini obat anti virus dengue belum ada dan program pengendalian vector masih belum berhasil mencegah KLB DBD. Vaksinasi merupakan strategi pengendalian paling efektif (Mustafa et al, 2008). Hingga saat ini belum ada vaksin dengue yang tersedia di pasaran, yang ada hanya kandidat vaksin dengue sehingga masih dibutuhkan pengembangan vaksin yang aman dan halal.

Virus Dengue ditularkan ke manusia melalui gigitan nyamuk yang telah terinfeksi terutama jenis nyamuk *Aedes aegypti* dan *Aedes albopictus* (Gubler, 1998). Virus Dengue termasuk dalam genus Flavivirus, famili Flaviviridae, terdiri dari 4 serotipe (DEN-1, DEN-2, DEN-3, dan DEN-4). Flavivirus merupakan virus yang memiliki *envelope*, *positive sense* RNA untai tunggal, dengan panjang genom 11 kb, dikelilingi oleh 180 kopi dari dua glikoprotein, mempunyai satu *open reading frame* yang dikode sebuah *polyprotein*. Amino terminal dari genom terdiri dari 3.400 asam amino, dikode 3 protein struktural dan 7 protein non struktural (Flamand et al, 1999, Mukhopadhyay et al, 2005).



Gambar 1. Protein structural dan non structural virus Dengue (Whitehead et al, 2007)

Virion DENV berbentuk spherical, mempunyai envelop dan berdiameter kira-kira 50 nm (lihat gambar 2.). Virion terdiri dari 3 protein structural (capsid (C), membran (M), envelope (E) dan RNA genome. Tiga structural protein berasal dari bagian N-terminal poliprotein dan diikuti oleh 7 protein non structural. Protein non struktural virus dengue adalah NS1, NS2A, NS2b, NS3, NS4A, NS4B dan NS5. (Lindenbach & Rice, 2001).



Gambar 2. Struktur virus dengue (Zang W et al, 2003).

Penyebab dominan DBD di Indonesia adalah virus Dengue serotipe 3 (DENV-3) genotip lokal (Suwandono et al, 2004). Virus DENV-3 diduga sebagai penyebab manifestasi kasus Demam Dengue berat yaitu Demam Berdarah Dengue atau Dengue Shock Syndrome dan merupakan serotipe yang paling luas distribusinya disusul DENV-2, DENV-1 dan DENV-4 (Corwin, et al 2001).

Hasil studi epidemiologi molekuler pada 311 penderita suspect Demam Berdarah Dengue di 3 RS DKI Jakarta th 2009 (Whinie, dkk) dengan pemeriksaan PCR menunjukkan serotype terbanyak adalah DEN 1 (21%) kemudian DEN 3 (12.5%) (Tabel 1). Hasil ini menunjukkan adanya perubahan serotype Dengue yang menonjol, hasil penelitian tahun sebelumnya lebih banyak didominasi oleh Dengue serotype 3 dan 2 tetapi pada tahun 2009 di DKI Jakarta lebih banyak Dengue serotype 1.

Tabel 1. Distribusi serotipe Dengue pada tersangka penderita DBD anak & dewasa di RS DKI (Th 2009)

Hasil PCR	Rumah Sakit Budi Asih, Koja , Tarakan		
	Anak (101)	Dewasa (210)	N(311)
Negative	43 (43%)	101 (48%)	61 (46%)
DEN 1	22 (22%)	43 (20%)	65 (21%)
DEN 2	9 (9%)	24 (11%)	33 (11%)
DEN 3	15 (15%)	24 (11%)	39 (12.5%)
DEN 4	11 (11%)	13 (6%)	24 (8%)
Mix (DEN 1+DEN 2)	1 (1%)	4 (2%)	5 (2%)
Mix (DEN 2+DEN 3)	-	1 (0.5%)	1 (0.3%)

Analisis phylogenetic (Dep. Mikrobiologi UI) menunjukkan bahwa strain DENV Indonesia berbeda dengan genotype di negara lain (Asia Tenggara) sehingga kemungkinan untuk menimbulkan respon imunologi spesifik diperlukan pengembangan strain lokal Indonesia.

Studi awal pengembangan vaksin menggunakan virus DEN inaktif menghasilkan hilangnya imunogenisitas virus sebagian karena proses inaktivasi (Schlesinger RW, 1977). Selanjutnya dikembangkan live attenuated vaccine yang dapat memicu kekebalan protektif tinggi, namun menimbulkan komplikasi klinis yang tidak diharapkan (Edelman R, et al 1994). Live attenuated vaccine ternyata juga berisiko menimbulkan replikasi virus yang dapat menyebabkan virus bermutasi kembali menjadi patogen & memicu respon imun yang merugikan (Shekhar, 2007). Sehingga pengembangan vaksin saat ini ke arah sub unit protein rekombinan dan DNA rekombinan vaksin. Tetapi pengembangan vaksin DNA rekombinan dikhawatirkan bisa mengakibatkan perubahan yang bersifat onkogen dan sukar untuk dihilangkan karena DNA vaksin terintegrasi ke chromosome host.

Tahun 2009 dan 2010 telah dilakukan penelitian pengembangan vaksin Dengue dengan teknologi sub unit protein rekombinan yang berasal dari protein Non Struktural 1 virus DEN 1 strain Indonesia (Bekasi 2003915846) dengan sistem ekspresi di *Pichia pastoris*. Pemilihan gen Non Struktural 1 pada studi ini sebagai pengganti gen struktural bertujuan untuk menghindari risiko anti-virion antibody perantara antibody-dependent enhancement (ADE) yang bisa mengakibatkan manifestasi Dengue Haemorrhagic Fever berat/ Dengue Shock Syndrom. Protein NS1 tidak tergabung dalam virion sehingga tidak menimbulkan virus enhancing antibody (Wu S.F, et al 2003). Protein Non Struktural 1 terdiri dari 1056 basa, 352 asam amino dengan berat molekul 40-46 kD, antigen pengikat komplemen yang dapat larut. NS1 ditemukan bersirkulasi di serum pasien terinfeksi virus dengue, menunjukkan bahwa sekresi NS1 merupakan hal penting pada infeksi Flavivirus di tubuh manusia. (Wu S.F et al, 2003). Protein NS1 juga adalah target penting dari antibodi terhadap DENV (Flamand et al, 1999, Wang et al, 2009)

Glikoprotein NS1 ada di seluruh Flavivirus dan berperan penting untuk replikasi & viabilitas virus (Flamand et al, 1999, Wang et al, 2009).

NS1 diekspresikan pada permukaan virus yang menginfeksi sel sehingga dapat menjadi target Tc cells spesifik virus melalui complement-mediated pathway (Schlesinger, J.J et al., 1987) dan antibody dependent cell cytotoxicity (ADCC) (Schlesinger, J.J et al., 1993). NS1 digunakan sebagai antigen yang penting bagi pengembangan vaksin dengue dan juga sebagai reagen untuk diagnosis cepat dengue (Zhou et al. 2006). Epitop NS1 virus Dengue yang bersifat imunogenik yang berperan sebagai target antibody untuk pengembangan vaksin maupun rapid test diagnostik yaitu:

1. ELKCGSGIF terletak pada asam amino ke 12-20 (Khan AM et al. 2006)
2. VHTWTEQYK terletak pada asam amino ke 25-33 (Andrew KI Falconar. 2007 & 2008)
3. VHTWTEQYKFQ terletak pada asam amino ke 25-35 (Khan AM et al. 2006)
4. EHKYSWKS terletak pada asam amino ke 110-117 (Wu HC et al. 2001).
5. HKYSWK terletak pada asam amino ke 111-116 (Yao et al. 1995)
6. HTLWSNGVLES terletak pada asam amino ke 229-239 (Khan AM et al. 2006)
7. GPWHLGKLE terletak pada asam amino ke 226-274 (Khan AM et al. 2006)
8. RGPSLRITTT terletak pada asam amino ke 294-302 (Khan AM et al. 2006)
9. Epitop LD2, 24A, LXI, 24C, dan ELK-type motif (Roehrig. 1997, Falconar et al 2007).

Studi pengembangan vaksin protein rekombinan NS1 pada beberapa penelitian menunjukkan bahwa NS1 sangat imunogenik serta dapat menimbulkan antibody protektif dengan aktivasi komplemen untuk membunuh target sel yang terinfeksi (Chaturvedi et al. 2005, Costa et al. 2006). Protein NS1 efektif tanpa menimbulkan risiko fenomena *antibody dependent enhancement (ADE)* yang mungkin disebabkan reaksi antibody non netralisir terhadap protein struktural E virus (Wu et al. 2003, Costa et al. 2006). Protein NS1 dapat menginduksi kekebalan seluler dan humoral jangka panjang (Wu et al. 2003, Costa et al. 2006).

Sistem ekspresi yang dipilih pada penelitian ini menggunakan sel eukariotik di *Pichia pastoris*. *Pichia pastoris* adalah spesies yeast methylotropic, famili *saccharomyces* yang merupakan sel inang ekspresi dengan level ekspresi protein yang tinggi, lebih cepat, tidak mahal serta lebih mudah dibandingkan sistem ekspresi eukariotik lainnya.

Plasmid yang digunakan sebagai vektor ekspresi adalah pPICZalphaB yang memiliki signal alpha factor sehingga dapat memberikan sistem ekspresi berupa sekresi yang memudahkan saat purifikasi. Selain itu juga *P.pastoris* merupakan organisme non patogen, protein rekombinan yang diekspresikan bebas pyrogen (tidak seperti ekspresi di *E.coli*), bebas toksin, dan bebas *viral inclusions* (tidak seperti ekspresi di *tissue culture*), tidak bersinggungan/ mengandung komponen hewan (tidak seperti ekspresi di *cell culture*) sehingga aman & halal untuk digunakan ke manusia (Etemad B, et al 2008).

Hasil penelitian tahun 2009-2011 telah dihasilkan construct dari plasmid rekombinan pPICZ alpha B di *E.coli* Top 10F yang mengekspresikan protein rekombinan NS1-DEN1. Kemudian telah diproduksi protein rekombinan DEN-1-NS1 dengan berat molekul 120 kDa yang merupakan homodimer menggunakan sistem ekspresi sekresi dari sel inang *Pichia pastoris*. Protein rekombinan yang dihasilkan telah diverifikasi dengan PCR, sekuensing, SDS PAGE dan ELISA dan masih menunjukkan respon imunogenisitas seperti bentuk wild typenya. Protein rekombinan NS1-DEN1 yang dihasilkan dapat dikembangkan untuk kit diagnostik dan vaksin. Pada penelitian ini diarahkan untuk pengembangan kandidat vaksin sehingga masih diperlukan penelitian lebih lanjut untuk mengetahui status kekebalan dan efikasi protektif dari subunit vaksin protein rekombinan NS1-DEN1.

RUMUSAN MASALAH

Penyakit demam berdarah dengue (DBD) sampai saat ini masih merupakan masalah kesehatan masyarakat di Indonesia dan merupakan salah satu program prioritas utama di bidang kesehatan. Hingga saat ini belum tersedia obat anti virus terhadap virus dengue dan program pengendalian vektor secara luas belum berhasil untuk mencegah KLB. Vaksinasi tampaknya adalah alternatif yang paling potensial sebagai strategi pengendalian yang paling efektif. Sampai saat ini belum ada vaksin Dengue yang tersedia di pasaran dan hanya ada kandidat vaksin sehingga masih dibutuhkan pengembangan vaksin yang aman dan halal. Saat ini pengembangan vaksin ke arah sub unit protein rekombinan dan DNA vaksin. Tetapi DNA vaksin memiliki keterbatasan adanya risiko onkogen yang sukar untuk dihilangkan karena DNA vaksin terintegrasi ke chromosome host.

Studi awal pengembangan vaksin menggunakan virus DEN inaktif menghasilkan hilangnya imunogenisitas virus sebagian karena proses inaktivasi (Schlesinger RW, 1977). Selanjutnya dikembangkan live attenuated vaccine yang dapat memicu kekebalan protektif tinggi, namun menimbulkan komplikasi klinis yang tidak diharapkan (Edelman R, et al 1994). Live attenuated vaccine ternyata juga berisiko menimbulkan replikasi virus yang dapat menyebabkan virus bermutasi kembali menjadi patogen & memicu respon imun yang merugikan (Shekhar, 2007). Saat ini pengembangan vaksin ke arah sub unit protein rekombinan dan DNA vaksin. Tetapi DNA vaksin memiliki keterbatasan adanya risiko onkogen yang sukar untuk dihilangkan karena DNA vaksin terintegrasi ke chromosome host.

Hasil studi epidemiologi molekuler pada 311 penderita suspect Demam Berdarah Dengue di 3 RS DKI Jakarta th 2009 (Whinie, dkk) dengan pemeriksaan PCR menunjukkan serotype terbanyak adalah DEN 1 (21%) kemudian DEN 3 (12,5%) Hasil ini menunjukkan adanya perubahan serotype Dengue yang menonjol, hasil penelitian tahun sebelumnya lebih banyak didominasi oleh Dengue serotype 3 dan 2 tetapi pada tahun 2009 di DKI Jakarta lebih banyak Dengue serotype 1. Kemudian dilanjutkan penelitian pengembangan vaksin diawali untuk Dengue serotype 1 menggunakan strain Indonesia, yang nantinya dikembangkan menjadi vaksin tetravalen.

Tahun 2009 dan 2010 telah dilakukan penelitian pengembangan vaksin Dengue dengan teknologi sub unit protein rekombinan yang berasal dari protein Non Struktural 1 virus DEN 1 strain Indonesia (Bekasi 2003915846) dengan sistem ekspresi di *Pichia pastoris*. Telah dihasilkan construct dari plasmid pPICZ alpha B di *E.coli* Top 10F yang mengekspresikan protein rekombinan DEN-1-NS1 dan telah diproduksi protein rekombinan DEN-1-NS1 dari sel inang *Pichia pastoris*. Protein rekombinan yang dihasilkan telah diverifikasi dengan PCR, sekuensing, SDS PAGE dan ELISA, ternyata masih menunjukkan respon imunogenisitas seperti bentuk wild typenya. Penelitian lanjutan dilakukan untuk mengetahui status kekebalan dan efikasi protektif dari subunit vaksin rekombinan NS1-DEN-1 pada hewan coba mencit.

II. TUJUAN

1. Tujuan Umum:

Mengetahui status kekebalan dan efikasi protektif dari vaksin subunit protein rekombinan NS 1-Dengue 1 yang berasal dari strain Indonesia (Bekasi 2003915846) pada mencit Balb/c.

2. Tujuan khusus:

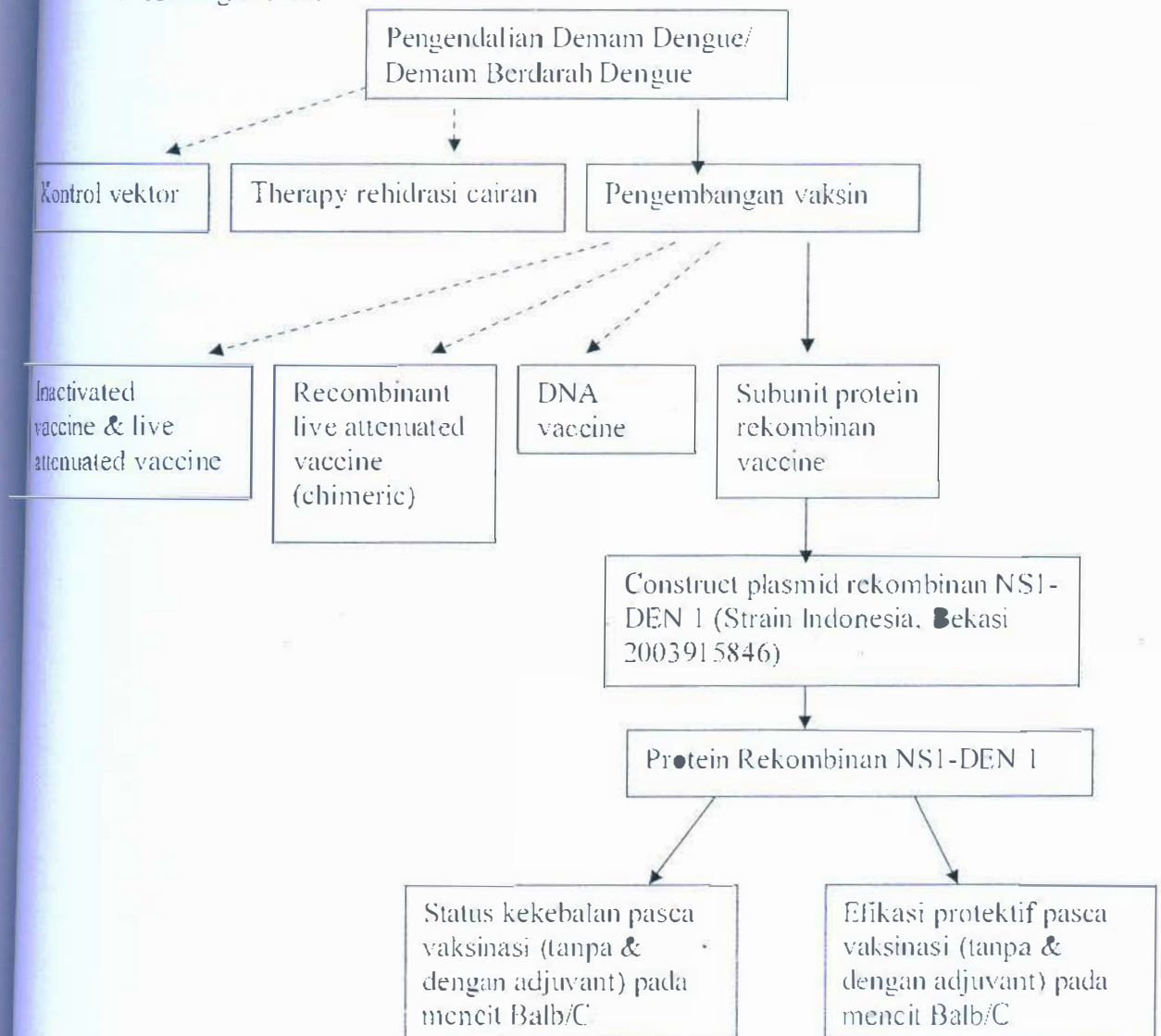
- a. Mengukur titer antibodi NS1-spesifik Ig G pasca vaksinasi subunit protein rekombinan NS 1-DEN 1 dengan dan tanpa adjuvant.
- b. Menilai efikasi protektif pasca vaksinasi subunit protein rekombinan NS1-DEN 1 dari hasil uji challenge.

III. MANFAAT

- a. Memberikan informasi bagi ilmu dasar untuk pengembangan prototype kandidat vaksin dengue strain Indonesia yang aman & halal.
- b. Menyediakan kandidat vaksin dengue strain Indonesia dengan teknologi subunit protein rekombinan bagi pengembangan vaksin di industri
- c. Dalam jangka panjang, hasilnya dapat dimanfaatkan bagi penyediaan vaksin dengue strain Indonesia untuk program pencegahan Demam Berdarah di masyarakat.

IV. METODE

1. Kerangka Pikir



2. Tempat dan Waktu Penelitian

- Penilaian status kekebalan dengan mengukur titer antibodi NS1-spesifik Ig G pasca vaksinasi subunit protein rekombinan NS 1-DEN 1 dengan dan tanpa adjuvant antibody dilakukan di Laboratorium Immunologi, Pusat Biomedis dan Teknologi Dasar Kesehatan.
- Penyiapan titer virus Dengue dengan Plaque Assay untuk uji challenge pasca vaksinasi dilakukan di Laboratorium Immunologi, Pusat Biomedis dan Teknologi Dasar Kesehatan.

- c. Vaksinasi dan uji challenge pada mencit Balb/c merupakan penelitian kerjasama yang dilakukan di Pusat Studi Primata, IPB-Bogor (PT Bimana Indomedical). Selama vaksinasi dan uji challenge, pemeliharaan dan perlakuan hewan coba memenuhi standar animal welfare dengan pengawasan rutin dokter hewan di PT Bimana Indomedical. Penelitian ini merupakan penelitian kerjasama yang melibatkan juga peneliti-peneliti di hewan coba rodent (PT. Bimana Indomedical) yang merupakan bagian dari PSSP-IPB Bogor. Perlakuan hewan coba yang meliputi tindakan yang bersifat invasive berupa suntikan untuk imunisasi, pengambilan darah di sinus retro-orbital, penyuntikan untuk uji challenge dilakukan oleh peneliti-peneliti terlatih yang telah mempunyai sertifikat untuk penanganan hewan coba rodent di PSSP-IPB Bogor. Sedangkan pengamatan selama vaksinasi dan uji challenge dilakukan oleh peneliti Pusat Biomedis & Teknologi Dasar Kesehatan didampingi oleh peneliti dari PSSP-IPB Bogor bagian hewan coba rodent.

Waktu: penelitian dilaksanakan selama 10 bulan dari bulan Maret sampai Desember 2012.

3. Desain Penelitian

Desain penelitian adalah studi eksperimental

4. Populasi dan Sampel

Populasi adalah seluruh mencit Balb/c umur 4 sampai 6 minggu.

Sampel adalah mencit Balb/c jantan umur 4 sampai 6 minggu yang memenuhi standar *specific pathogen free (SPF)*. Jumlah sample yang dibutuhkan adalah 50 mencit mendapatkan perlakuan sesuai standar dengan *animal welfare*. Setiap perlakuan terdiri dari 10 mencit yaitu vaksinasi dengan sub unit protein rekombinan NS1-DEN1 dengan adjuvant alum dan Freund adjuvant dan tanpa adjuvant. Kelompok control adalah yang divaksin dengan plasmid pPICZalpha3 dan tanpa vaksinasi.

5. Jenis Penelitian

Jenis penelitian adalah uji preklinik dengan eksperimental laboratorium menggunakan model hewan coba mencit Balb/c.

6. Uji Laboratorium

a. Vaksinasi mencit Balb/c

a.1. Penyiapan protein rekombinan NS1- DEN1 dan formulasi dengan adjuvant

Clone nomer 54 yang mengekspresikan protein rekombinan NS1-DEN1 diekspresikan sesuai protocol untuk produksi dalam skala besar di media BMVY dengan induksi methanol 1%.

Larutan supernatant kemudian dikonsentrasi dengan metode ultrafiltrasi. Hasil konsentrat dipurifikasi dengan metal chelating affinity chromatographic (MACA) column. Formulasi complete Freund adjuvant dengan mengemulsikan volume yang sama dalam Phospat Buffer Saline (PBS) yang berisi 50 ug protein rekombinan dan adjuvant sampai volume akhir 200 ul per mencit. Formulasi dengan adjuvant aluminium hydroxide gel dilakukan dengan membuat larutan 1:1 (adjuvant: protein rekombinan dalam PBS) sampai volume akhir 200 ul.

a.2. Mencit jantan Balb/c umur 4-6 minggu dengan berat badan kurang lebih 10-15 gram yang memenuhi standar SPF diinjeksi intramuscular pada m. tibialis anterior kaki belakang dengan konsentrasi 50 ug protein rekombinan NS1-DEN1 yang diformulasi dengan adjuvant Freund complete dan alum. Kelompok kontrol diinjeksi dengan 50 ug pPICZalphaB dalam 50 ul PBS dan kelompok control lainnya tidak diimunisasi. Mencit diimunisasi sebanyak 3 dosis yang diberikan dengan interval 1 minggu. Pengambilan darah sebanyak 100 ul dilakukan pada sinus retroorbital sebelum dan 1 minggu setelah imunisasi dosis terakhir. Setiap perlakuan pada mencit sesuai standar *animal welfare*.

b. Penyiapan titer virus Dengue serotype 1 untuk uji challenge

- Penyiapan sel C6/36 untuk recovery (pemulihan)

Sel dari stok (liq. Nitrogen) inkubasi pada water bath (37°C) selama 3 – 5 menit. Sebelum cair semua pindahkan kedalam tabung sentrifus 15 ml yang berisi 3 ml MEM. Sentrifus 1500 rpm selama 10 menit. Buang supernatant, tambahkan 1 ml MEM dengan FBS 10% mix hingga menjadi homogen. Masukkan ke dalam flask yang sudah ada 4 ml MEM FBS 10 %, inkubasi pada suhu 28°C.

- Penyiapan sel C6/36 untuk pemeliharaan

Ganti medium sehari setelah recovery. Ganti medium setiap 2-3 hari atau ketika pH medium mulai turun ,atau ketika ada vakuolisasi dan medium terlihat kotor. Gunakan medium yang hangat.

- Penyiapan sel C6/36 untuk Pasase

Sel monolayer, buang medium sisakan ± 1 – 2 ml. Dengan menggunakan cell scraper, usap bagian permukaan flask yang ditumbuhi sel agar sel terlepas. Mix supernatant sel agar gumpalan sel terlepas. Bagi supernatant sel pada beberapa flask yang sudah diisi 5 ml MEM FBS 2 %. Inkubasi pada suhu 28°C.

- Tahap inokulasi virus (Yamada et al, 2002)

Sel monolayer C6/36, buang medium. Tambahkan 500 µl supernatant virus Dengue 1. Inkubasi pada suhu 28°C, agitasi setiap 30 menit selama 1 – 2 jam. Tambahkan 5 ml MEM FBS 2%. Inkubasi pada 28°C selama 7 hari. Supernatan virus di dalam media diambil kemudian di sentrifuge 2000 rpm selama 5 menit. Bagi supernatant sel pada beberapa cryo vial (1 ml per cryovial).

- Tahap preservasi dan penghitungan titer virus

Sel monolayer BHK 21, buang medium. Tambahkan 5 ml PBS (tanpa Ca dan Mg) pH 7.4 untuk membilas sel dan menghilangkan FBS yang dapat menghambat kerja Trypsin. Buang PBS, tambahkan 1 ml Trypsin EDTA inkubasi pada 37°C selama 5 menit. Tambahkan 2 ml MEM FBS 2% untuk menghentikan aktivitas Trypsin. Mix supernatant sel sehingga gumpalan sel terlepas. Sentrifus 1500 rpm selama 5 menit. Buang supernatant, tambahkan MEM dengan FBS 10%. Bagi ke dalam plate 6 well (sebanyak 1×10^6 per ml), inkubasi selama 1 hari di 37°C dengan CO2 5% hingga 75% monolayer. Infeksikan dengan serial pengenceran 10 kali supernatan virus (mulai dari 10^1 dengan perbandingan 25 ul supernatan virus + 225 ul medium MEM + FBS 2%) sampai pengenceran 10^6 (Metode Yamada et al, 2000).

Ambil masing-masing 100 ul dari setiap pengenceran ke sel BHK yang sudah disiapkan untuk menghitung virus dengan plaque (dibuat duplo). Setelah 2 jam tambahkan medium semi solid (MEM + FBS2% + methyl cellulosa 1%). Inkubasi 37°C dengan 5% CO₂ selama 7 hari. Kemudian sel difiksasi dengan formalin 10% dan diwarnai dengan gentian violet. Kemudian dilakukan penghitungan plaque.

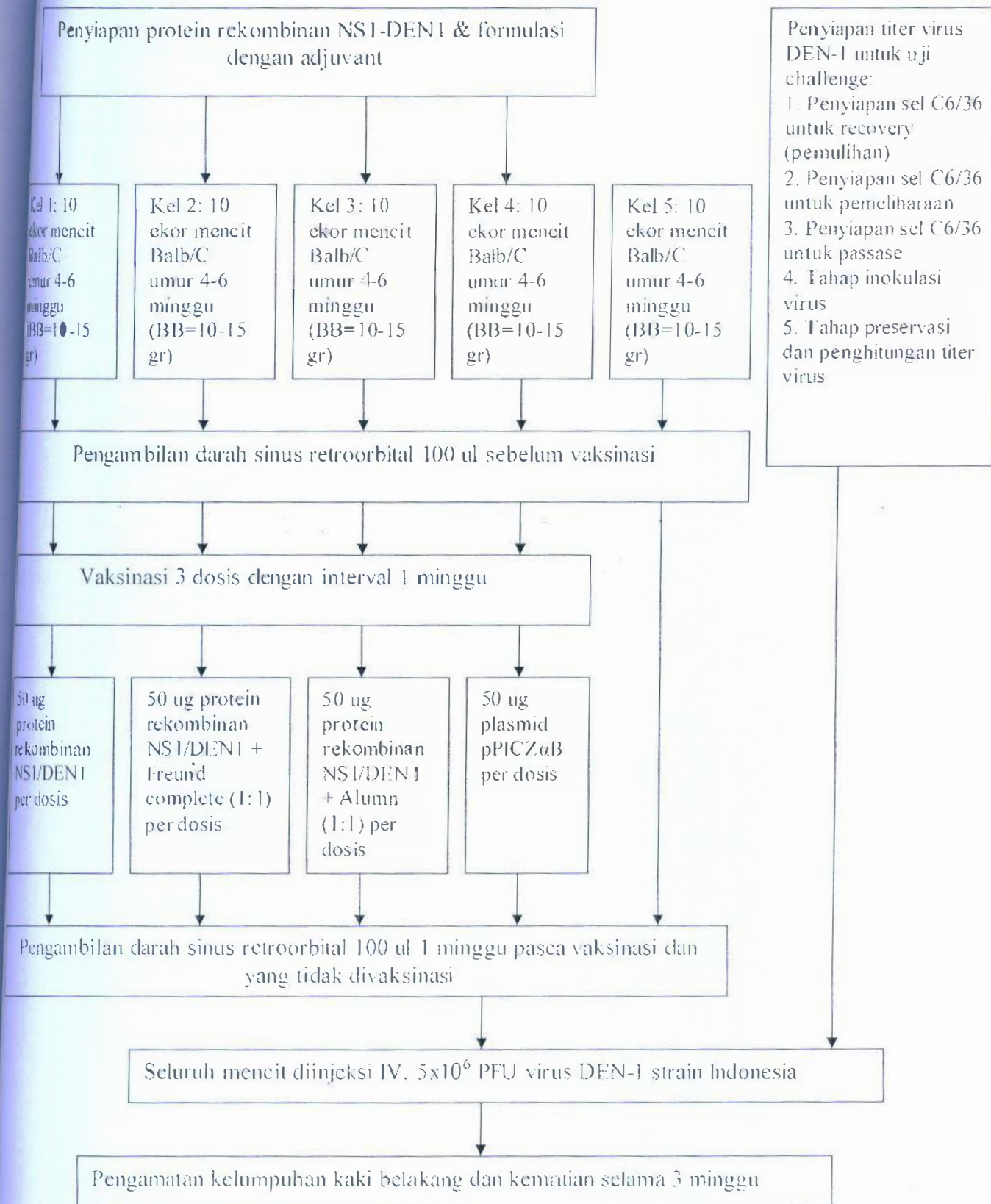
c. Uji challenge

Dua minggu setelah dosis kedua, 5 kelompok mencit sesuai kelompok iminisasi di atas, diinjeksi iv dengan dosis 5×10^6 plaque-forming unit dari virus DEN-1 strain Indonesia. Setelah di challenge, diamati setiap hari untuk morbiditas dan mortalitasnya selama 3 minggu. Morbiditas ditentukan dengan jumlah mencit yang mengalami kelumpuhan kaki belakang.

d. Pengukuran titer antibodi NS1-spesifik Ig G dengan metode ELISA (sesuai prosedur Costa et al, 2006)

Serum yang diperoleh dengan pengambilan dari sinus retro-orbital pada mencit yang diimunisasi dianalisa untuk mengukur adanya antibody NS1 spesifik. Konsentrasi serum anti NS1 ditentukan dengan pengenceran sampai optimum dalam PBS yang berisi 10% BSA, 0,05% tween-20. Plate ELISA microtiter 96 well dilapisi dengan protein NS1 rekombinan. Protein rekombinan NS1 dengan **konsentrasi 0,1 ug** dalam 100 ul PBS dilapisi pada setiap well dan diinkubasi semalam. Setelah itu dilakukan blocking untuk mencegah ikatan non spesifik dengan menginkubasi selama 1 jam dengan larutan 5% skim milk dalam 200 ul PBS untuk setiap well. Serial dilusi dari sample serum sebanyak 50 ul ditambahkan di setiap well dan diinkubasi semalam pada suhu 4°C. Kemudian sample di cuci dengan larutan PBS/Tween 20, ikatan protein dideteksi dengan HRP-conjugated goat anti-mouse IgG. Perubahan warna dihasilkan dengan penambahan 2,2'-azino-bis (ethylbenzthiazoline sulfonic acid). Kemudian absorbansi pada 450 nm diukur dengan mesin ELISA reader. Sebagai control digunakan serum dari mencit yang tidak diimunisasi.

BAGAN ALUR KERJA PENELITIAN

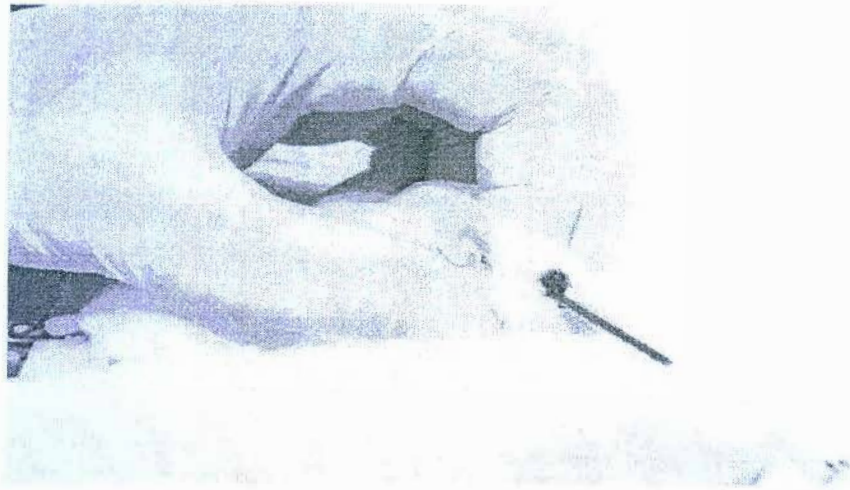


V. HASIL PENELITIAN

Penelitian telah mendapatkan persetujuan *Ethical Approval* dari Komisi Etik Penelitian Kesehatan, Badan Litbangkes, dengan nomor KE 01 06/ EC/989/2012 tanggal 6 Juni 2012. Penyiapan vaksin protein rekombinan rNS1 yang akan digunakan untuk vaksinasi dalam 1 batch (satu kali pembuatan untuk seluruh dosis vaksin yang akan digunakan) dilaksanakan di laboratorium imunologi Pusat Biomedis dan Teknologi Dasar Kesehatan. Penyiapan dan karantina hewan coba mencit Balb/c sebelum eksperimental dilakukan di laboratorium hewan rodent PSSP-IPB Bogor (PT Bimana Indomedical). Mencit yang digunakan untuk eksperimental berumur 6 minggu. Sebelum vaksinasi, dilakukan pengambilan darah untuk memperoleh data dasar. Pengambilan darah pada sinus retro orbital dilakukan sesuai standar *animal welfare* dengan terlebih dahulu melakukan anestesi. Anestesi dilakukan menggunakan ketamin dengan dosis 120 mg/kg BB ditambah xylazine dosis 10 mg/kg BB.

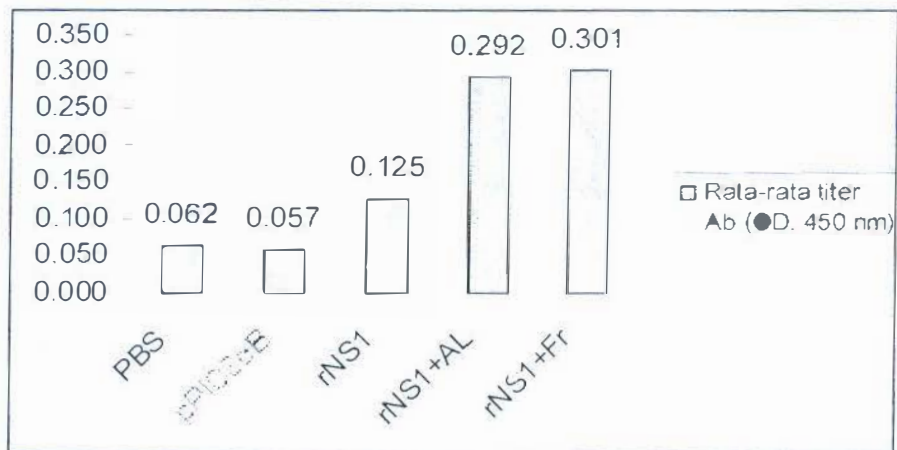


Gambar 1: Anestesi mencit Balb/c secara intra peritoneal dengan Ketamin dan Xylazine sebelum pengambilan darah.



Gambar 2. Pengambilan darah sinus retro orbital.

Pemberian vaksinasi dilakukan sebanyak 3 kali dengan interval 1 minggu dan dosis protein rekombinan rNS1 50 ug/ml tanpa adjuvant dan dengan adjuvant Aluminium hidroksida dan Freund . Hasil status kekebalan pada miceit Balb/c yang telah divaksinasi dengan protein rekombinan rNS1, diberi adjuvan aluminium hidroksida dan Freund dengan rata-rata titer antibodi (OD 450 nm) berturut-turut sebagai berikut 0.125; 0.292; 0.301. Hasil ini menunjukkan telah terjadi peningkatan titer antibodi dibandingkan dengan kelompok kontrol yang divaksin dengan PBS (titer antibodi: 0.062) dan plasmid pPICZαB (titer antibodi: 0.057) (grafik 1). Rata- rata titer antibodi lebih tinggi pada pemberian vaksin dengan adjuvant dibandingkan tanpa adjuvant (grafik 1). Pemberian vaksin protein rekombinan dengan adjuvant Freund hasilnya lebih tinggi dari pada adjuvant Aluminium hidroksida karena adjuvant Freund merupakan adjuvant yang sesuai untuk miceit Balb/c. Namun pemberian dengan adjuvant Alum juga menunjukkan titer antibodi yang lebih tinggi dibandingkan vaksin yang tanpa adjuvant dan adjuvant alum merupakan adjuvant yang sesuai untuk manusia. Sehingga untuk pemberian vaksin protein rekombinan rNS1 juga dapat dipertimbangkan tambahan adjuvant Alum untuk menghasilkan respon kekebalan yang lebih optimal.



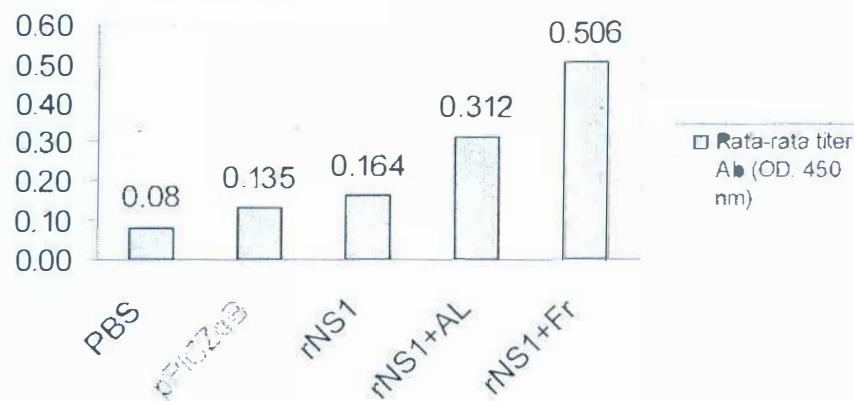
Grafik 1. Rata-rata titer Antibodi pasca vaksinasi untuk menunjukkan status kekebalan terhadap Dengue serotype 1 dengan metode ELISA.

Uji challenge dilakukan pada mencit Balb/c setelah 1 minggu pasca vaksinasi dosis ketiga dengan konsentrasi titer virus Dengue serotype 1 sebesar 7.5×10^5 PFU dalam 100 ul secara intravena. Saat uji challenge, mencit sudah berumur 9 minggu. Sebelum uji challenge, mencit dianestesi dengan ketamin dan xylazine.



Gambar 3. Uji challenge dengan injeksi intravena pada vena cauda dengan konsentrasi titer virus Dengue serotype 1 sebesar 7.5×10^5 PFU.

Hasil uji challenge tidak ditemukan kelumpuhan dan kematian pada seluruh kelompok mencit Balb/C. Penelitian Wu et al, 2003 menunjukkan bahwa susceptibilitas dipengaruhi oleh umur, sehingga uji challenge sebaiknya dilakukan pada mencit umur kurang dari 6 minggu. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa mencit Balb/c kurang susceptible karena dilakukan pada mencit umur diatas 6 minggu yaitu umur 9 minggu. Sehingga kekebalan protektif diukur dengan titer antibodi pasca uji challenge. Rata-rata titer antibodi pasca uji challenge dengan wild type virusnya menunjukkan kenaikan yang lebih tinggi dibandingkan dengan pasca vaksin yaitu berturut-turut dengan vaksin protein rekombinan rNS1, dengan adjuvant Alum dan Freund sebagai berikut: 0,164; 0,312; 0,506 (grafik 2.). Hasil ini menunjukkan bahwa vaksinasi dengan protein rekombinan dapat memberikan respon kekebalan protektif terhadap infeksi virus Dengue liar.



Grafik 2. Pengukuran ELISA: rata-rata titer antibodi terhadap virus Dengue pasca uji Challenge.

VIII. PERSETUJUAN ATASAN

Jakarta, 14 Januari 2013

DISETUJUI

Kabid Biomedis



Dr. Roselinda, M. Kes
NIP. 195807011987012001

Ketua Pelaksana



dr. C.S. Whinie Lestari, M.Kes
NIP. 196912061999032001

Ketua Panitia Pembina Ilmiah



Dr. Drg. D. A. Magdarina, M.Sc
NIP. 195012061984022001

Kepala Pusat Biomedis dan
Teknologi Dasar Kesehatan



Drs. Ondri Dwisampurno M.Si, Apt
NIP. 196211191988031001

Daftar Kepustakaan

Chambers TJ, Hahn CS, Galler R, Rice CM. Flavivirus genome organization, expression and replication. *Ann Rev Microbiol* 1990;44:649-88.

Corwin, A.L. Larasati, R.P. Bangs M.J, Bang MJ, Wuryadi S, Arjoso S, Sukri N, Listyaningsih E, Hartati S, Namursa R, Anwar Z, Chandra S, Loho B, Ahmad H, Campbell JR, Porter KR. Epidemic transmission in Southern Sumatra, Indonesia. *Trans R. Soc. Trop. Med Hyg* 95: 257-265. 2001.

Costa SM, Freire MS, Alves AMB. DNA vaccine against the non-structural 1 protein (NS1) of dengue 2 virus. *Vaccine* 2006;24: 4562-4564.

Edelman R, Tacket CO, Wasserman SS, Vaughn DW, Eckels KH, Dubois DR, et al. A live attenuated dengue-1 vaccine candidate (45/AZ5) passaged in primary dog kidney cell culture is attenuated and immunogenic for human. *J Infect Dis* 1994; 170(6):1448-55

Etemad B, Batra G, Raut R, Dahiya S, Khanam S, Swaminathan S, Khanna N. An envelope domain III-based chimeric antigen produced in *Pichia pastoris* elicits neutralizing antibodies against all four dengue virus serotype. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2008;79(3): 353-363

Falconar A K I. Antibody responses are generated to immunodominant ELK/KLE-Type motifs on the nonstructural- glycoprotein during live dengue virus infections in mice and human: implications for diagnosis, pathogenesis, and vaccine design. *Clin. Vaccine Immunol* 14(5): 493-504. 2007.

Falconar AKI. Monoclonal antibodies that bind to common epitopes on the dengue virus type 2 nonstructural-1 and envelope glycoproteins display weak neutralizing activity and differentiated responses to virulent strains: implications for pathogenesis and vaccines. *Clin Vaccine Immunol* 15(3):549-61. 2008.

Filamand M, Megret F, Mathieu M, Lepault J, Rey F.A, Deubel V. Dengue virus type 1 nonstructural glycoprotein NS1 is secreted from mammalian cells as a soluble hexamer in a glycosylation-dependent fashion. *J. Virol.* 6104-6110. 1999.

Gubler D.J. Dengue and dengue hemorrhagic fever. *Clin Microbiol Rev* 1998;11:480-96.

Khan AM, Miotto O, Heiny AT, Salmon J, Srinivasan KN, Nascimento EJM, Marques JrETA, Brusica V, Tan TW, August JT. A systematic bioinformatics approach for selection of epitope-based vaccine targets. *Cell Immunol* 244(2):141-47. 2006.

Lindenbach BD and Rice CM. Flaviviruses and their replication. In Fields Virology. Fourth Edition, Edited by David M Knipe and Peter M Howly. Published by Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia. 2001.

Monath T P. Dengue and yellow fever-challenges for the development and use of vaccines. *N Engl J Med*, 357(22): 2222-2225. 2007.

Roehrig J.T. Immunochemistry of dengue viruses. In Dengue and dengue haemorrhagic fever. Division of vector-borne infectious diseases CDC and prevention US department of health and human services. P. 199-210. 1997.

Schlesinger RW. Dengue viruses. *Viol Monogr* 1977;16: 1-132

Schlesinger JJ, Brandriss MW and Walsh EE. Protection of mice against dengue 2 virus encephalitis by immunization with the dengue 2 virus non-structural protein NS1. *J Gen Virol.*, 68:853-7. 1987.

Schlesinger JJ, Foltzer M and Chapman S. The Fc portion of antibody to yellow fever virus NS1 is a determinant of protection against yellow fever encephalitis in mice. *Virology*. 192:132-41. 1993.

Suwandono, A. Listiyaningsih, E. Vasudevan, S. et al. Genetic Changes in the Pre-membran (prM) and Envelope (E) Genes of Indonesian Dengue 3 Viruses Isolated from Outbreak of Increasing Severity. A Poster Presentation. ASTMH Meeting. 7-10 November 2004. Miami. 2004.

Tajima S, Takasaki T, Kurane I. Characterization of Asn130-to-Ala mutant of dengue type 1 virus NS1 protein. *Virus Gene* 4: 323-9. 2008.

Yao ZJ, Kao MC, Loh KC, Chung MC. A serotype-specific epitope of dengue virus 1 identified by phage displayed random peptide library. *FEMS Microbiol Lett* 127(1-2):93-8. 1995.

Wu HC, Huang YL, Chao TT, Jan JT, Huang JL, Chiang HY, King CC, Shaio MF. Identification of B-cell epitope of dengue virus type 1 and its application in diagnosis of patients. *J. Clin. Microbiol.* 2001.

Zang W, Chipman PR, Corver J, Johnson PR, Zhang Y, Mukhopadhyay S, Baker TS, Strauss JH, Rossmann MG, Kuhn RJ. Visualization of membrane protein domains by cryo-electron microscopy of dengue virus. *Nat Struct Biol*:10(11):907-12. 2003.

Zhou JM, Tang YX, Fang DY, Zhou JJ, Liang Y, Guo HY, Jiang LF. Secreted expression and purification of dengue 2 virus full-length non-structural glycoprotein NS1 in *Pichia pastoris*. *Virus Genes* 33:27-32. 2006.



KEMENTERIAN KESEHATAN
BADAN PENELITIAN DAN PENGEMBANGAN KESEHATAN
Jalan Percetakan Negara No. 29 Jakarta 10560 Kotak Pos 1226
Telepon: (021) 4261088 Faksimile: (021) 4243933
E-mail: sesban@litbang.depkes.go.id, Website: http://www.litbang.depkes.go.id

PERSETUJUAN ETIK (ETHICAL APPROVAL)

Nomor : KE.01.06/EC/ 489 /2012

Yang bertanda tangan di bawah ini, Ketua Komisi Etik Penelitian Kesehatan Badan Litbang Kesehatan, setelah dilaksanakan pembahasan dan penilaian, dengan ini memutuskan protokol penelitian yang berjudul :

"Status Kekebalan dan Efikasi Protektif dari Vaksin Subunit Protein Rekombinan NS 1-Dengue 1 (Strain Indonesia, Bekasi 2003915846) pada Mencit (Balb/c)"

yang mengikutsertakan hewan percobaan sebagai subyek penelitian, dengan Ketua Pelaksana / Peneliti Utama :

dr. C. S. Whinie Lestari, M.Kes.

dapat disetujui pelaksanaannya. Persetujuan ini berlaku sejak tanggal ditetapkan sampai dengan batas waktu pelaksanaan penelitian seperti tertera dalam protokol.

Pada akhir penelitian, laporan pelaksanaan penelitian harus diserahkan kepada KEPK-BPPK. Jika ada perubahan protokol dan / atau perpanjangan penelitian, harus mengajukan kembali permohonan kajian etik penelitian (amandemen protokol).

Jakarta, 6 Juni 2012

Ketua
Komisi Etik Penelitian Kesehatan
Badan Litbang Kesehatan,


Prof. Dr. M. Sudomo