

ANTIBODI MONOKLONAL TERHADAP ANTIGEN VIRUS DENGUE-3

MONOCLONAL ANTIBODIES SPECIFIC FOR DENGUE-3 VIRUS ANTIGEN

*Purwantiningsih, *Djoko Wahyono, dan **Wayan T. Artama
*Lab. Farmakologi & Toksikologi Fak. Farmasi UGM
**Fak. Kedokteran Hewan UGM

ABSTRAK

Demam Berdarah Dengue (DBD) merupakan salah satu jenis penyakit menular yang disebabkan oleh virus dengue dan seringkali mengakibatkan kematian. Untuk mengurangi angka kematian diperlukan suatu metoda deteksi dini DBD. Tetapi, sejauh ini berbagai upaya penegakan diagnosis yang ada belum memberikan hasil yang memuaskan.

Metode baru yang tengah dikembangkan adalah metoda ELISA (*Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*). Untuk diagnosis baru ini dibutuhkan antibodi spesifik dan mempunyai afinitas tinggi terhadap antigen virus dengue (antibodi monoklonal). Tujuan penelitian ini adalah untuk memperoleh antibodi monoklonal yang dapat diproduksi dengan teknik hibridasi dan kloning berulang.

Produksi antibodi monoklonal spesifik terhadap antigen virus dengue-3 dilakukan dalam beberapa tahap. Tahap pertama adalah imunisasi terhadap sekelompok mencit Balb/c dengan cara menyuntikkan antigen virus dengue untuk memperoleh respon imun terhadap antigen virus. Tahap ke dua yaitu fusi sel mieloma dan limfosit yang berasal dari mencit Balb/c. Tahap ke tiga merupakan kultivasi sel hibrid hasil fusi. Selanjutnya sel hibrid yang memproduksi antibodi monoklonal dikloning menggunakan metode pengenceran untuk mendapatkan klon yang homogen.

Dari hasil fusi antara sel mieloma (NS-1) dan limfosit mencit Balb/c yang diimunisasi dengan antigen virus dengue-3 diperoleh 24 klon hibridoma yang memproduksi antibodi spesifik terhadap antigen virus dengue-3.

Kata kunci: demam berdarah dengue (DBD), ELISA, antibodi monoklonal, kloning

ABSTRACT

Dengue Haemorrhagic Fever (DHF) is an epidemic disease caused by dengue viruses and frequently causes death. To decrease the mortality due to DHF, an early detection method is badly needed. However, up to the present the existing efforts have yet yielded a satisfactory result.

A new method being developed is ELISA (*Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*). This new diagnosis needs a specific antibody with a high affinity to dengue virus antigen termed as monoclonal antibody. The aim of this research is to obtain monoclonal antibody produced by hybridization technique and repetitive cloning.

The production of monoclonal antibody specific to dengue virus consists of three stages. First, immunization of Balb/c mice using dengue-3 virus antigen to elicit immune response. Secondly, fusion of myeloma cells (NS-1) and lymphocytes obtained from treated-Balb/c mice and

finally, cultivation of hybrid cells yielded from fusion. Monoclonal antibody producing hybrid cell was then cloned using dilution method in order to obtain homogen clone.

The result suggested that 24 hybridoma clones, producing specific monoclonal antibodies against dengue-3, were acquired

Key words: dengue haemorrhagic fever (DHF), enzyme linked immuno sorbent assay (ELISA), monoclonal antibody, cloning

PENDAHULUAN

Penyakit Demam Berdarah Dengue (DBD) merupakan jenis penyakit menular yang telah tersebar luas diseluruh dunia, baik di daerah tropik maupun subtropik yang disebabkan oleh virus dengue. Epidemio dengue yang besar terjadi di Kuba pada tahun 1981, pada saat itu terdapat 344.203 kasus, 10.312 diantaranya termasuk derajat berat dan 158 penderita meninggal (Khouri *et al.*, 1969). Selain di Asia Tenggara dan Kepulauan Karibia, dengue terdapat di daerah Pasifik Bagian Barat, Australia, Afrika, Mediterania dan Amerika (Anonim, 1985).

Di Indonesia DBD mulai menimbulkan masalah kesehatan sejak ditemukannya kasus tersebut di Surabaya dan Jakarta pada tahun 1986 (Partana *et al.*, 1970). Kemudian menyebar ke seluruh Indonesia sehingga sampai tahun 1990 hanya propinsi Timor Timur yang belum terjangkau penyakit ini (Soedarto, 1990).

Upaya penanggulangan penyakit DBD di Indonesia dibagi menjadi 3 kegiatan yaitu :

- a. Kegiatan program pemberantasan DBD
- b. Kegiatan peran serta masyarakat yaitu Pemberantasan Sarang Nyamuk (PSN) dan pemantauan jentik secara berkala di dusun/RW oleh kader dan PSN DBD di sekolah-sekolah melalui Usaha Kesehatan Sekolah (UKS).
- c. Kegiatan penatalaksanaan penderita DBD di Puskesmas dengan perawatan dan Rumah Sakit.

Salah satu tujuan program pemberantasan dengue di Indonesia adalah menurunkan angka kematian dengan jalan diagnosis klinis yang lebih tepat dan sensitif, pemantauan penderita yang intensif dan melaporkan kasus sedini mungkin (Soedarto, 1990).

Sebenarnya WHO (Anonim, 1985) telah memberikan beberapa kriteria diagnosis klinis *Dengue Haemorrhagic Fever* (DHF) akan tetapi kriteria WHO tersebut kurang cocok bila digunakan untuk diagnosis klinis pada masa akut penyakit. Oleh karena itu masih diperlukan kriteria diagnostik alternatif yang dapat digunakan pada masa akut penyakit, sebelum saat kritis muncul dan dapat diterapkan di daerah pedesaan.

Suatu kriteria diagnostik alternatif yang lebih sederhana dan memenuhi nilai kepraktisan yang memadai adalah berkisar pada munculnya demam dan limfosit plasma biru, akan tetapi apapun diagnosis klinis yang ditemukan tetap mutlak diperlukan konfirmasi virologis atau serologis (Sutaryo, 1991).

Konfirmasi serologis yang klasik adalah dengan cara uji HI (*Haemagglutination Inhibition*) (Hasyimi, 1990). Uji ini berdasar pada sifat virus yang mampu menggumpalkan darah dan dapat dihambat oleh serum yang mengandung antibodi homolog terhadap antigen (virus) yang dipakai (Soedarmo, 1983). Cara ini baik tetapi masih sering terjadi reaksi silang dengan jenis virus *arbovirus* yang lain. *Dengue blot* (Chan, 1990) juga dilaporkan kurang baik untuk deteksi infeksi primer dan terlalu banyak positif palsu (Harun, 1990). Cara yang paling baru adalah diagnosis dengan metode *ELISA* (*Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*), akan tetapi metode ini mempunyai sensitivitas dan spesifitas yang belum memuaskan untuk kasus dengue, sehingga sampai saat ini masih dikembangkan.

Virus dengue terdiri atas empat macam serotipe yaitu serotipe 1, 2, 3 dan 4, tetapi dari keempat macam serotipe tersebut, serotipe-3 merupakan serotipe yang selalu dominan dibanding serotipe lain. Disamping itu dengue-3 juga merupakan serotipe yang paling luas distribusinya dan paling banyak berhubungan dengan berat ringannya kasus (Soedarmo, 1983). Oleh karena itu virus dengue serotipe-3 dipilih sebagai obyek penelitian.

Tujuan penelitian ini adalah mendapatkan sel-sel hibridoma yang berasal dari satu klon yang homogen dan mampu memproduksi antibodi spesifik (antibodi spesifik terhadap virus dengue-3). Selanjutnya antibodi tersebut dapat dipergunakan untuk mengembangkan teknik diagnosis dini DBD secara tepat dan pasti.

METODOLOGI

Bahan. Antigen hasil isolasi dan antigen *crude D-3* (Namru-2), sel mieloma NS1, sel pendukung dan splenosit dari mencit Balb/c, Konjugat anti IgG mencit terlabel Alkalin Fosfatase (Sigma), dan bahan kimia lain dari Gibco dan Sigma.

Alat. *Laminar air flow hood* (Labquid), Inkubator CO₂ (Napco 322), *Inverted mikroskop* (Olimpus, TO41), *Microplate* 96 sumuran (Nunc), *Refrigerated sentrifuge* IEC (CENTRA 7R), *ELISA Reader*, *Culture Flask*.

Jalan penelitian

Imunisasi mencit Balb/c dengan antigen virus dengue-3. Imunisasi pada sekelompok mencit Balb/c umur 8-10 minggu dilakukan pada hari ke-1, 14, 35 dan 110 (dosis 50 µg/mencit; i.p.), pengambilan darah pada hari ke-117 melalui *plexus retroorbitalis*. Uji ELISA dilakukan untuk memilih mencit dengan respon terbaik dan digunakan untuk fusi. Tiga hari sebelum fusi mencit *dibooster* untuk meningkatkan respon imun menggunakan metode Wahyono (1990).

Sebelum fusi sel dilaksanakan, harus dilakukan persiapan-persiapan yaitu: penumbuhan sel mieloma, pemanenan dan penghitungan sel mieloma, preparasi polietilenglikol (PEG), preparasi mieloma untuk mendapatkan mieloma fase logaritmik, preparasi sel *feeder*, preparasi limfosit, setelah semua siap baru dilakukan fusi sel.

Fusi sel mieloma dengan limfosit. Dalam 10 ml suspensi limfosit, ditambahkan sel mieloma (5:1) atau (1:1) jika yang terhitung limfoblast saja. Campuran sel tersebut disentrifus 200 g selama 10 menit pada suhu kamar. Pelet yang diperoleh dipisahkan dari supernatan dengan pipet. Fusi dilakukan dengan bantuan PEG. Sel hasil fusi dikultivasi ke dalam *microplate* 96-sumuran yang telah berisi makrofag dengan volume 100 µl/sumuran.

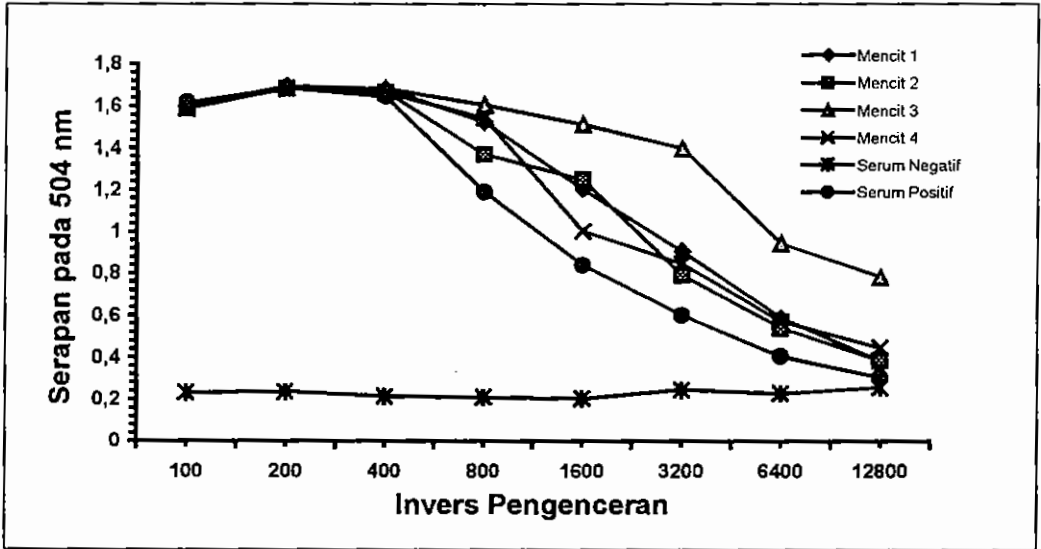
Pemeliharaan sel hibrid. Seratus mikroliter media kultur secara regular diambil dan diganti dengan media yang mengandung hipoksantin, aminopterin dan himidin (HAT) baru. *Microplate* diobservasi tiap sumuran untuk melihat sel hibrid yang tumbuh. Jika hibrid telah tumbuh baik, supernatan kultur diuji aktivitas antibodinya dengan metode ELISA. Sel yang positif dipindahkan ke *costarplate* 24-sumuran, kemudian dikloning menggunakan metode *limiting-dilution*.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Imunisasi Mencit.

Mencit Balb/c umur 8-10 minggu, disuntik dengan antigen virus dengue-3 secara intra peritoneal atau subkutan dengan dosis 50 µg/mencit.

Imunisasi dimaksudkan untuk menstimulir sejumlah klon limfosit. Klon limfosit yang terstimulir akan berproliferasi dan berdeferensiasi menjadi sel plasina yang mampu menghasilkan antibodi. Dilakukan test ELISA untuk memilih mencit dengan respon imun terbaik, hasil test ELISA dapat dilihat pada Gambar 1. Selanjutnya mencit tersebut di booster untuk meningkatkan respon imunnya dan digunakan untuk fusi.



Gambar 1. Respon imun mencit pada hari ke-117 imunisasi

Persiapan sebelum Fusi Sel.

Sebelum fusi sel dilakukan maka segala sesuatu yang dibutuhkan lebih baik dipersiapkan sehari sebelumnya, yaitu penyiapan media dan peralatan, penyiapan sel makrofag yang berfungsi sebagai sel pendukung, serta sel mieloma fase logaritmik. Sel mieloma ini berada dalam fase mitosis dan kondisi yang segar sehingga diharapkan fusi berjalan baik dan sel tidak mati saat fusi berlangsung.

Fusi Sel.

Sebelum pelaksanaan fusi dilakukan pemanenan dan penghitungan sel mieloma, kemudian dilakukan preparasi limfosit. Fusi dilakukan dengan mencampurkan suspensi limfosit dan mieloma (5:1). Prosedur kerja sedapat mungkin dipatuhi sesuai waktu-waktu yang ditetapkan, terutama saat penambahan PEG dan pengenceran dengan media, karena merupakan saat kritis terjadinya fusi.

Dari hasil fusi sel dapat diperoleh berbagai kemungkinan, yaitu fusi antara limfosit dengan mieloma, (ini yang diharapkan), sel mieloma dengan mieloma, limfosit dengan limfosit, fusi antar beberapa sel dan sel mieloma atau limfosit bebas yang tak terfusiikan. Hasil fusi dapat dilihat pada tabel I.

Tabel I. Prosen Populasi sel hibrid pada minggu ke-2 fusi

<i>Microplate</i>	Jumlah Populasi Sel (sumuran)	Jumlah Total Sumuran	Prosen sel (%)
I	75	96	78
II	74	96	77
III	66	96	67
IV	61	96	64

Dalam medium seleksi HAT semua sel akan mati kecuali sel hibrid yaitu sel hasil fusi antara limfosit dengan sel mieloma, karena sel hibrid tetap mampu mengadakan biosintesis nukleotida melalui jalur metabolisme pintas, dengan menggunakan enzim Timidin Kinase (TK) dan Hipoksantin-Guanin-Fosforibosil-Transferase (HGPRT) yang dimilikinya.

Koloni sel hibrid akan terus berkembang dan bila telah mencapai 2/3 bidang penglihatan mikroskop dapat dilakukan test ELISA untuk memilih sel hibrid produser dan non-produser. Dari sekian banyak sumuran positif sel hibrid hanya 24 sumuran yang positif baik memproduksi antibodi (Tabel II).

Selanjutnya dilakukan kloning dan rekoning untuk memperoleh hibridoma homogen. Kloning dilakukan dengan teknik pengenceran, dengan prinsip diperoleh kepadatan 0.5 sel/sumuran, untuk satu deret terakhir (kolom 12 *microplate*) dan kepadatan 5 sel/sumuran (kolom 1-11). Hibridoma homogen dan positif memproduksi antibodi dikembangkan dalam *flask* untuk selanjutnya disimpan dalam nitrogen cair atau digunakan untuk produksi antibodi monoklonal secara *in vivo* atau *invitro*.

Tabel II. Titer antibodi supernatan kultur ke duapuluh empat populasi sel hibrid produser pada *microplate* 96 sumuran.

Populasi sel	Absorban	Populasi sel	Absorban
1C7	0,487	2F7	0,467
1E1	0,458	2G5	0,410
1E10	0,964	3B8	0,545
1F1	0,536	3D8	0,622
1F8	0,440	3D11	1,299
1F9	1,060	3E9	0,501
1F12	0,608	3G9	0,575
1G2	0,568	4C1	0,689
1G7	0,496	4D6	0,635
1H9	0,423	4E10	0,562
2C10	0,430	4F8	1,576
2F1	1,415	4G11	0,517

Keterangan : Kontrol negatif (0,203), Kontrol positif (1,556) (serum pengenceran 1:100)

KESIMPULAN

Dari fusi sel mieloma (NS-1) dan limfosit mencit Balb/c yang diimunisasi dengan antigen virus dengue-3 diperoleh 24 klon hibridoma yang memproduksi antibodi spesifik terhadap antigen virus dengue-3.

DAFTAR PUSTAKA

- Anonim, 1985, *Viral Haemorrhagic Fevers*, Report of WHO Expert Committee, WHO, Geneva, 721, 14-16.
- Chan, Y. C., Lai, O.F., Ngoh, B.L., Tan, H.C. and Chan, L., 1990, *Dengue Diagnosis Using Commercial Kit (Dengue Blot). A prospective Study* International Symposium on Dengue Haemorrhagic Fever, 1-3 Oktober, Bangkok, Thailand.
- Harun, S.R., 1990, Dengue Blot, Test Diagnostik Demam Berdarah Dengue, *Warta DBD*, 1-3.
- Hasymi, M., 1990, Evaluasi Pemeriksaan Secara Uji Hemaglutinasi Inhibisi (Test HI) Untuk Diagnosis Penderita Demam Berdarah, *Cermin Dunia Kedokteran*, 20-23, 60.
- Khoury, L.K., Wulur, H., Karsono, A., and Thaib, S., 1969, Haemorrhagic Fever in Jakarta, *Maj. Kedok. Ind.*, 19, 417-466.
- Partana, L., Partana, J.S. and Tharir, M.D., 1970, Haemorrhagic Fever Shock Syndrome in Surabaya Indonesia, *Kobc, J. Med, Sci.*, 16, 189-193.
- Soedarmo, S.S.P., 1983, *Demam Berdarah (Dengue) Pada Anak*, UI Press, Jakarta, 140-142.
- Sutaryo, 1991, *Limfosit Plasma Biru, Arti Diagnosis dan Sifat Immunologik Pada Infeksi Dengue*, Tesis. UGM, Yogyakarta.
- Soedarto, 1990, Penyakit-penyakit Di Indonesia, *Widya Medika*, Jakarta. 36-37.
- Wahyono, D., 1990, Production et Characterisation d'Anticorps Monoclonaux Diriges Contre la Digoxine Interet en Immunoanalyse, *These*, Universite de Montpellier I, Unites de Formation et de Recherche Pharmaceutiques. Montpellier.