

ABSTRAK

Demam Chikungunya disebabkan oleh virus Chikungunya (CHIKV), suatu Alfavirus family *Togaviridae*, yang dibawa nyamuk *Aedes aegypti* dan *Aedes albopictus*. Di Indonesia, Chikungunya ditemukan pertama kali tahun 1973 dan masih ada sampai sekarang. Secara klinis gejala Chikungunya sulit dibedakan dengan demam berdarah, sementara penanganan kedua penyakit tersebut sangat berbeda. Diagnosis Chikungunya dapat dibantu dengan pemeriksaan laboratorium melalui isolasi virus, *Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction* (RT-PCR) atau ELISA, namun alatnya mahal dan perlu staf yang terlatih. Untuk memudahkan diagnosis, telah tersedia secara komersial alat uji cepat Chikungunya impor dengan metode Pengujian Aliran Lateral (PAL). Telah dilakukan pengujian sensitivitas dan spesifisitas dua produk uji cepat impor terhadap spesimen di Jakarta dan Bandung, pengujian menunjukkan bahwa sensitivitas produk terhadap IgM Chikungunya hanya 20,5% dengan spesifisitas 100% untuk produk pertama dan sensitivitas 50,8% dengan spesifisitas 89,2% untuk produk kedua. Alat uji cepat yang sensitif terhadap CHIKV sangat diperlukan untuk membantu diagnosis penyakit Chikungunya. Protein fungsional yang berperan sebagai salah satu komponen dalam alat uji cepat dapat dibuat menggunakan fragmen antibodi yang memiliki sensitivitas tinggi terhadap antigen CHIKV. Pada penelitian ini dilakukan analisis sekuen CHIKV Indonesia dan Afrika/ECSA, pengkajian interaksi antara Fab CHIKV dengan antigen CHIKV, dan menentukan Fab terbaik sebagai kandidat scFv secara *in silico*. Dirancang ScFv yang dapat teramobilisasi pada membran nitroselulosa (ScFv-DI) dan yang dapat membentuk konyugat dengan nanopartikel emas (ScFv link C). Protein diekspresikan dalam sel inang *Escherichia coli* BL21 (DE3). Kedua ScFv dikarakterisasi sebelum dilakukan uji fungsinya. Pengujian afinitas kedua ScFv terhadap antigen CHIKV dilakukan menggunakan *Surface Plasmon Resonance*. Hasil penelitian terdapat perbedaan sekuen E1E2 Chikungunya di Indonesia dengan Afrika/ECSA, ada 21 mutasi. Perbedaan sekuen tidak menyebabkan afinitas yang berbeda jauh antara CHIKV Indonesia dan ECSA terhadap Fab CHK-152 yang dipilih untuk dikembangkan sebagai ScFv. Desain ScFv-DI dan ScFv link C telah diperoleh secara *in silico*. Kedua ScFv dapat terekspresi pada inang *E. coli* BL21 (DE3) dengan media Terrific Broth, bahan penginduksi L-rhamnosa 2,5 mM, marka seleksi antibiotik kanamisin, lama induksi 48 jam pada suhu 37 °C dengan kecepatan pengadukan 250 rpm. Protein ekstraseluler rScFv-DI rekombinan memiliki berat molekul 36,4 kDa dan ScFv link C rekombinan sebesar 26,3 kDa. rScFv-DI dapat teramobilisasi pada membran nitroselulosa dengan baik. rScFv link C dapat membentuk konyugat dengan nanopartikel emas. Kedua ScFv memiliki afinitas terhadap protein E2 antigen CHIKV hasil pengujian dengan metode *Surface Plasmon Resonance*. Energi ikatan dan nilai KD rScFv-DI terhadap protein E2 CHIKV adalah sebesar -7,3715 kkal/mol dan $3,17 \times 10^{-6}$ M, dan untuk rScFv link C sebesar -7,3715 kkal/mol dan $3,04 \times 10^{-6}$ M. rScFv-DI dan rScFv link C dapat diusulkan digunakan sebagai komponen alat uji cepat metode pengujian aliran lateral (PAL) terhadap antigen virus Chikungunya.

Kata kunci : Chikungunya, uji cepat, fragmen antibodi, amobilisasi, konyugat nanopartikel emas, afinitas

ABSTRACT

Chikungunya fever is caused by the Chikungunya virus (CHIKV), an Alphavirus of the Togaviridae family, which is carried by the Aedes aegypti and Aedes albopictus mosquitoes. In Indonesia, Chikungunya was first discovered in 1973 and still exists today. Clinically, the symptoms of Chikungunya fever are difficult to distinguish from dengue fever, while the treatment for the two diseases is very different. Diagnosis of Chikungunya can be assisted by laboratory tests through virus isolation, Reverse Transcriptase- Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) or ELISA, but the equipment is expensive and requires trained staff. To facilitate diagnosis, a commercially available imported Chikungunya rapid test kit with the Lateral Flow Assay (LFA) method is available. Tests for the sensitivity and specificity of two imported rapid test products were carried out on specimens in Jakarta and Bandung. The tests showed that the sensitivity of the product to Chikungunya IgM was only 20.5% with a specificity of 100% for the first product and a sensitivity of 50.8% with a specificity of 89.2% for the second product. Rapid test kits that are sensitive to CHIKV are needed to help diagnose Chikungunya disease. A functional protein that acts as a component in a rapid assay can be made using antibody fragments that have high sensitivity to CHIKV antigens. In this study, analysis of Indonesian and African CHIKV/ECSA sequences was carried out, studied the interaction between CHIKV Fab and CHIKV antigen, and determined the best Fab as an ScFv candidate by in silico method. Two ScFv were designed, those can be immobilized on nitrocellulose membranes (ScFv-DI) and which can form conjugates with gold nanoparticles (ScFv link C). The protein was expressed in Escherichia coli BL21 (DE3) cells as host. The two ScFv were characterized before their function tests were performed. Testing the affinity of the two ScFv for the CHIKV antigen was carried out using Surface Plasmon Resonance. The results showed that there were differences in the E1E2 Chikungunya sequences in Indonesia and Africa/ECSA, there were 21 mutations. Sequence differences did not cause much different affinity between CHIKV Indonesia and ECSA for the CHK-152 Fab which was chosen to be developed as ScFv. The ScFv-DI and ScFv link C designs were obtained in silico. Both ScFv could be expressed on host E. coli BL21 (DE3) with Terrific Broth medium, 2.5 mM L-rhamnose inducer, kanamycin antibiotic selection marker, induction time of 48 hours at 37 °C with agitation speed of 250 rpm. The recombinant ScFv-DI extracellular protein has a molecular weight of 36.4 kDa and the recombinant ScFv link C is 26.3 kDa. rScFv-DI can be immobilized on nitrocellulose membranes well. rScFv link C can form conjugates with gold nanoparticles. Both of ScFvs have an affinity for the CHIKV antigen E2 protein as a result of testing using the Surface Plasmon Resonance method. The bond energy and KD value of rScFv-DI for E2 CHIKV protein is -7.3715 kcal/mol and 3.17×10^{-6} M, and for rScFv link C it is -7.3715 kcal/mol and 3.04×10^{-6} M. rScFv-DI and rScFv link C can be proposed to be used as a component of the lateral flow assay method (LFA) rapid test kit against Chikungunya virus antigen.

Keywords: Chikungunya, rapid test, antibody fragment, immobilization, gold nanoparticle conjugate, affinity