

## BAB I

### PENDAHULUAN

#### 1.1 Latar Belakang Penelitian

Demam Chikungunya disebabkan oleh virus Chikungunya (CHIKV), suatu Alfavirus family Togaviridae, yang dibawa nyamuk *Aedes aegypti* (*A. aegypti*) dan *Aedes albopictus* (*A. albopictus*). Gejala klinis demam Chikungunya mirip dengan gejala demam berdarah dengue, yaitu demam mendadak, menggigil, muka kemerahan, mual, muntah, nyeri punggung, nyeri kepala, fotofobia, dan bintik-bintik kemerahan terutama di daerah badan. Gejala lain yaitu nyeri sendi, utamanya di sendi siku, lutut, pergelangan kaki dan sendi-sendi kecil di pergelangan tangan dan kaki. Nyeri berlangsung beberapa hari sampai satu minggu.

Di Indonesia, Chikungunya ditemukan pertama kali tahun 1973. Pada tahun 1982 dan 1983 muncul wabah yang cukup luas di Kalimantan, pulau Jawa, Sumatera dan pulau lain. Setelah 20 tahun menghilang, demam Chikungunya muncul lagi tahun 2001 dan dinyatakan sebagai kejadian luar biasa pada tahun 2003 (Kosasih *et al.*, 2013). Dalam kurun waktu 2009 – 2010 dilaporkan terjadi 137.655 kasus Chikungunya di Indonesia (Harapan *et al.*, 2019). Hingga tahun ini masih dilaporkan munculnya kasus Chikungunya di beberapa tempat di Indonesia, kasus yang penderitanya cukup banyak terakhir adalah KLB Chikungunya di Bima, Nusa Tenggara Barat pada tahun 2022.

Sebelum tahun 2023 jarang dilaporkan kematian disebabkan demam Chikungunya. Namun, pada bulan Juni 2023 *European Centre for Disease Prevention and Control* melaporkan bahwa dari 214.317 kasus yang muncul sejak awal tahun 2023,

sebanyak 281 orang meninggal. Mayoritas penderita berasal dari Brazil, Paraguay, Argentina, Bolivia dan Thailand. Kasus meninggal terjadi di Brazil sebanyak 25 orang dan Paraguay 256 orang (ECDC, 2023). Munculnya kasus kematian yang cukup tinggi perlu meningkatkan kewaspadaan terhadap penanganan yang tepat, dimulai dengan deteksi penyakit pada penderita.

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 *Enzyme - linked Immunosorbent Assay* (ELISA). Pemeriksaan laboratorium memerlukan peralatan khusus dan tenaga laboratorium yang terlatih, namun tidak semua fasilitas kesehatan memiliki peralatan dan tenaga yang dibutuhkan. Untuk memudahkan diagnosis, telah tersedia secara komersial alat uji cepat Chikungunya impor dengan metode Pengujian Aliran Lateral (PAL). Alat ini berbahan dasar kertas, lebih mudah penggunaannya, dapat dilakukan oleh tenaga kesehatan tanpa pelatihan khusus dan tidak memerlukan peralatan yang kompleks (Kosasih *et al.*, 2012).

Telah dilakukan pengujian sensitivitas dan spesifisitas dua produk uji cepat impor terhadap spesimen yang diperoleh dari relawan dan penderita Chikungunya di Jakarta dan Bandung, pengujian menunjukkan bahwa sensitivitas produk terhadap Immunoglobulin M (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. Salah satu komponen dalam alat uji cepat dapat dibuat menggunakan fragmen antibodi yang memiliki sensitifitas tinggi terhadap antigen

CHIKV. Sifat pengikatan suatu antibodi terhadap antigen dapat dipelajari dengan simulasi biomolekuler secara *in silico* memanfaatkan basis data antibodi dan antigen CHIKV yang tersedia secara online.

Alat uji cepat metode PAL dirancang memiliki tempat penambahan sampel, ruang konyugasi, garis uji, garis kontrol dan ruang adsorben untuk menyerap sisa cairan (Damborský *et al.*, 2016). Prinsip yang digunakan pada alat uji cepat metode PAL adalah pengikatan antigen oleh antibodi yang telah diimobilisasi pada kertas, atau pengikatan antigen pada antibodi yang pada sisi lain juga terikat pada antibodi sekunder. Reaksi yang terjadi dipantau dengan suatu biosensor berwarna seperti nanopartikel emas.

Kit diagnostik berbasis kertas yang ada di pasaran umumnya menggunakan antibodi utuh baik IgM atau Immunoglobulin G (IgG) yang ukuran molekulnya cukup besar. Berat molekul satu antibodi monoklonal utuh sekitar 146 kDa (Wang, *et al.*, 2018). Pengenalan antigen oleh suatu antibodi dapat dilakukan oleh fragmen antibodi saja, yaitu fragmen variabel yang memiliki sisi pengenalan terhadap epitop antigen. *Single chain variable fragment* (scFv) adalah fragmen antibodi yang berperan mengenali epitop dari suatu antigen dan memiliki sisi pengikatan terhadap antigen. ScFv terdiri dari rantai VH (*heavy chain*) dan VL (*light chain*) yang dihubungkan oleh suatu linker, ukuran scFv berkisar hanya sekitar 28 – 30 kDa (Monnier, *et al.*, 2013). ScFv telah pernah digunakan dan berhasil mendeteksi toksin bakteri (Zhu, *et al.*, 2014). Dengan kemampuan mengenali epitop antigen oleh scFv, penggunaan antibodi utuh yang ukuran molekulnya cukup besar dapat digantikan oleh scFv.

ScFv dapat diproduksi secara rekombinan pada sel *Escherichia coli* (*E. coli*) karena ukuran molekulnya yang lebih kecil. Biaya produksi ScFv menggunakan *E. coli* jauh lebih murah dibandingkan dengan biaya produksi antibodi monoklonal yang harus

menggunakan sel mamalia. Dengan demikian produk yang menggunakan scFv dapat diproduksi dengan harga yang lebih ekonomis dibandingkan produk yang menggunakan antibodi monoklonal.

Salah satu kelemahan scFv untuk digunakan pada kit berbasis kertas adalah afinitasnya yang rendah terhadap membran nitroselulosa, sehingga sulit menempel pada kertas. Untuk meningkatkan afinitas scFv pada kertas, protein dibuat dalam bentuk fusi dengan protein yang memiliki afinitas tinggi terhadap kertas. Protein tersebut akan berperan sebagai protein jangkar bagi penempelan scFv. Salah satu protein sintetik yang dapat digunakan sebagai protein jangkar adalah protein *Design One* (DI). Protein DI dirancang dengan sekuen asam amino dan struktur molekul yang memudahkan menempel pada membran nitroselulosa. DI telah berhasil digunakan untuk menempelkan hemaglutinin (HA) yang afinitasnya rendah terhadap membran nitroselulosa (Koga *et al.*, 2012; Holstein *et al.*, 2015).

Terjadinya reaksi antigen-antibodi pada alat uji cepat metode PAL dapat teramati secara visual karena salah satu bahan yang akan bereaksi telah diberi label/pewarna. Nanopartikel emas yang berwarna merah dapat diikat dengan scFv yang memiliki asam amino sistein pada sekuennya. Munculnya warna merah pada garis uji alat uji cepat menandakan scFv pada konjugat nanopartikel emas telah berhasil mengikat antigen CHIKV.

Berdasarkan analisis situasi dan kebutuhan terhadap alat uji cepat yang sensitif terhadap antigen CHIKV, maka pada penelitian ini akan dilakukan perancangan protein fungsional berbasis scFv. Pemilihan fragmen antibodi yang akan dijadikan scFv dilakukan berdasarkan uji interaksi dan kemampuan menetralkan antigen CHIKV yang dilakukan secara *in silico*. ScFv dirancang dalam dua tipe, yang pertama dapat

teramobilisasi pada membran nitroselulosa (ScFv-DI) dan yang kedua scFv yang dapat mengikat nanopartikel emas (ScFv link C). Kedua protein akan dapat difungsikan sebagai komponen dalam alat uji cepat untuk mendeteksi antigen CHIKV. Protein diekspresikan dalam sel inang *E. coli*. Kedua scFv akan dikarakterisasi sebelum dilakukan pengujian terhadap fungsinya. Uji fungsi terdiri dari uji amobilisasi pada membran nitroselulosa dan pengujian afinitas scFv terhadap antigen CHIKV menggunakan *Surface Plasmon Resonance* (SPR).

Untuk penggunaan dalam alat uji cepat antigen CHIKV metode PAL, dirancang scFv yang memiliki afinitas baik terhadap antigen CHIKV Afrika/*East-Central-South-African* (ECSA) maupun Asia, khususnya terhadap protein *Envelope Glycoprotein 1* (E1) – *Envelope Glycoprotein 2* (E2) CHIKV. Penggunaan scFv anti CHIKV pada alat uji cepat berbasis kertas belum pernah dilaporkan, oleh karena itu penggunaan scFv sebagai pengganti antibodi utuh dalam kit diagnostik metode PAL yang dapat mendeteksi E1-E2 CHIKV Indonesia /Asia dan juga CHIKV Afrika/ECSA adalah suatu kebaruan yang ditawarkan oleh penelitian ini. Untuk menempelkan scFv pada membran nitroselulosa, scFv CHIKV dalam bentuk fusi dengan protein DI belum pernah dilaporkan, sehingga protein fusi ScFv-DI merupakan suatu kebaruan lain yang ditawarkan penelitian ini. Kebaruan ketiga yang ditawarkan penelitian ini adalah ScFv link C yang dapat mendeteksi antigen CHIKV Asia/Indonesia dan Afrika/ECSA serta dapat membentuk konyugat dengan nanopartikel emas.

Kandidat scFv dipilih berdasarkan data fragmen antibodi CHIKV yang telah tersedia struktur kristalnya dalam basis data protein di *Protein Data Bank* (PDB), scFv dibuat modelnya, demikian juga antigen CHIKV Indonesia, kemudian dilakukan simulasi biomolekuler. Pengujian scFv secara *in silico* meliputi *docking* dan simulasi

dinamika molekuler. ScFv yang sensitif terhadap epitope CHIKV baik CHIKV Indonesia maupun CHIKV Afrika/ECSA selanjutnya akan dikonstruksi gen pengkode proteinnya, yaitu ScFv-DI dan ScFv link C. Kedua protein diekspresikan menggunakan inang sel *E. coli*. Protein fusi diuji amobilitasnya pada membran nitroselulosa dan selanjutnya diujicobakan afinitasnya terhadap antigen CHIKV. ScFv link C akan digunakan sebagai pembanding amobilitas scFv pada membran (tanpa fl), dan fungsi lain sebagai scFv berlabel (warna merah) untuk mendeteksi terjadinya reaksi scFv-antigen CHIKV.

Komponen alat uji cepat yang dikembangkan ini diharapkan dapat menjadi suatu produk baru yang sensitif terhadap CHIKV, baik strain Indonesia/Asia maupun CHIKV Afrika/ECSA, sehingga produk dapat dipakai secara luas di seluruh dunia. Produk diharapkan dapat memudahkan diagnosis pasien Chikungunya di Indonesia dan mampu mensubstitusi produk kit impor. Keuntungan lain dari kit yang dirancang untuk mendeteksi antigen CHIKV adalah pemeriksaan pada pasien dapat dilakukan lebih awal (pada masa inkubasi virus), karena tidak perlu menunggu terbentuknya titer antibodi yang cukup tinggi dalam darah pasien.

## **1.2 Rumusan Masalah atau Identifikasi Masalah**

Berdasarkan uraian di atas, maka dapat diidentifikasi beberapa masalah sebagai berikut :

1. Bagaimana perbedaan sekuens protein E1-E2 antigen CHIKV yang berasal dari Indonesia dan E1-E2 Afrika/ECSA dan pengaruhnya terhadap sifat pengikatannya terhadap antibodi jika dianalisis menggunakan metode *in silico*?
2. Bagaimana desain protein fungsional berbasis fragmen antibodi yang dapat mengikat bagian E1-E2 antigen CHIKV dan dapat digunakan sebagai komponen dalam alat uji cepat metode PAL?

3. Apakah protein fungsional berbasis fragmen antibodi yang dapat mengikat antigen Chikungunya dan dapat digunakan sebagai komponen dalam alat uji cepat metode PAL dapat diekspresikan oleh inang *E. coli* BL21(DE3)?
4. Apakah fungsi protein fungsional sebagai komponen dalam alat uji cepat deteksi antigen Chikungunya bekerja sesuai rancangan?
5. Bagaimana afinitas protein fungsional terhadap antigen CHIKV yang dianalisis menggunakan metode SPR?

### 1.3 Tujuan dan Manfaat

Berdasarkan identifikasi masalah yang telah diuraikan sebelumnya, maka penelitian ini bertujuan :

1. Menganalisis perbedaan antara sekuens protein E1-E2 antigen CHIKV yang berasal dari Indonesia dan Afrika/ECSA serta mempelajari sifat pengikatannya terhadap antibodi menggunakan metode *in silico*.
2. Merancang protein fungsional berbasis fragmen antibodi yang dapat mengikat antigen CHIKV dan dapat digunakan sebagai komponen alat uji cepat metode PAL.
3. Mengekspresikan protein fungsional berbasis fragmen antibodi yang dapat mengikat antigen CHIKV dan dapat digunakan sebagai komponen alat uji cepat metode PAL menggunakan inang *E. coli* BL21(DE3).
4. Menguji fungsi protein fungsional sebagai komponen dalam alat uji cepat deteksi antigen Chikungunya sesuai tujuan perancangannya.
5. Menguji afinitas protein fungsional terhadap antigen Chikungunya menggunakan SPR.

#### 1.4 Manfaat Penelitian

Secara saintifik, penelitian ini berguna untuk mengembangkan pengetahuan dan keahlian yang meliputi kemampuan menggunakan data sekuen antigen dan epitope CHIKV sebagai acuan bagi pemilihan sekuen scFv, teknik perancangan protein berbasis struktur secara *in silico*, mengekspresikan protein yang dirancang, pengujian amobilitas protein hasil rancangan pada membran nitroselulosa yang digunakan pada alat uji cepat dan pengujian afinitas protein fungsional terhadap antigen CHIKV menggunakan alat SPR.

Kegunaan praktis dari penelitian ini adalah tersedianya protein fungsional berbasis fragmen antibodi yang dapat teramobilisasi pada membran nitroselulosa (ScFv-DI) dan dapat mengikat nanopartikel emas (ScFv link C) dan keduanya dapat digunakan sebagai komponen dalam sistem deteksi cepat antigen Chikungunya. Alat uji cepat yang menggunakan protein fungsional ini sensitif dan spesifik sehingga dapat mendeteksi adanya infeksi Chikungunya sesegera mungkin untuk membantu dokter menegakkan diagnosis yang tepat pada pasien. Test dapat dilakukan lebih awal karena pengujian dilakukan terhadap antigen virus, tidak perlu menunggu terbentuknya antibodi dalam tubuh pasien. Selain itu, diagnostik yang spesifik memiliki dampak yang baik untuk pelayanan kesehatan di masyarakat, seperti menurunnya jumlah kesalahan diagnosis dan menghindari kesalahan penanganan pada pasien.