

## Studi Ekspresi Antibodi dengan Stimulasi Peptida Sekuens Spesifik dari gp350/220 (EBV) pada Sel B

Bambang Pristiwanto <sup>1)\*</sup>, Muhaimin Rifa'i <sup>2)</sup>

<sup>1)</sup> Program Studi Sarjana Biologi, Fakultas MIPA, Universitas Brawijaya, Malang

<sup>2)</sup> Jurusan Biologi, Fakultas MIPA, Universitas Brawijaya, Malang

Diterima 15 Agustus 2013, direvisi 27 September 2013

### ABSTRAK

Karsinoma Nasofaring (KNF) disebabkan oleh *Eipstein Barr Virus* (EBV) yang menyerang epitel nasofaring. EBV menggunakan protein gp350/220 dalam mekanisme infeksi pada reseptor permukaan epitel nasofaring, reseptor CR2. Tujuan penelitian ini adalah untuk melakukan pengujian hasil konstruksi kandidat vaksin pada hewan coba secara *in vivo*. Hewan coba yang digunakan adalah mencit (*Mus musculus*) galur Balb/C. Pada perlakuan digunakan anak mencit berumur 2 minggu. Hasil perlakuan injeksi menggunakan peptida sekuens spesifik epitop pada infeksi EBV terhadap sel epitel nasofaring menunjukkan hasil ekspresi antibodi IgM (2,01%) lebih tinggi dibandingkan dengan kontrol (1,02%). Hasil injeksi dengan peptida sekuens spesifik tersebut menunjukkan hasil ekspresi antibodi IgD (75,74%) lebih tinggi dibandingkan dengan kontrol (65,59%). Sebaliknya injeksi dengan peptida sekuens spesifik menghasilkan ekspresi antibodi IgA (0,57%) lebih rendah dan berbeda signifikan dibandingkan dengan kontrol (1,93%).

**Kata kunci :** antibodi, sel B, peptida sekuens spesifik gp350/220, karsinoma nasofaring.

### ABSTRACT

Nasopharyngeal Carcinoma (NPC) is caused by *Eipstein Barr Virus* (EBV) which attack nasopharyngeal epithelium. EBV uses protein gp350/220 in the infection mechanism in nasopharyngeal epithelial surface receptor, CR2. The purpose of this study was to test the vaccine candidate at *in vivo* method. *Mus musculus*(Balb/C) mice were used as animal model. In this experiment mice pups in the age of 2 weeks were used. Injection using a specific peptide sequences from EBV showed higher expression of IgM (2,01%) compared to control (1,02%). Injection of this peptide to mice pups also increase the expression of IgM. After injection with this peptide, IgD also increase (75,74) compare to control (65,59%) without manipulation. In contrast, injection of this peptide decrease the expression of IgA antibodies (0,57%) significantly compare to control (1,93%).

**Keywords:** antibody, B cell, specific peptide sequences gp350/220, nasopharyngeal carcinoma.

### PENDAHULUAN

Penyakit pada manusia dapat disebabkan oleh suatu organisme patogen, seperti virus, bakteri, atau jamur patogen. Penyakit yang dapat diderita oleh manusia atau hewan salah satunya disebabkan virus. Virus merupakan agen infeksi yang berdiamater berkisar 20

sampai 300 nm, yang hanya mampu memperbanyak diri dalam sel organisme hidup. Beberapa virus tertentu dapat menyebabkan terjadinya proliferasi sel yang tidak terkendali untuk membantu dalam memperbanyak dirinya, sehingga menimbulkan suatu penyakit yang disebut karsinoma. Salah satu penyakit tersebut adalah Karsinoma Nasofaring (KNF) yang menyerang pada epitel nasofaring yang terletak di belakang hidung dan di atas bagian belakang tenggorokan. KNF disebabkan oleh infeksi EBV (*Epstein Barr Virus*). Reseptor yang

-----  
\*Corresponding author :

E-mail: pristiwa\_01@yahoo.co.id

diduga berperan dalam infeksi EBV ke dalam sel epitel nasofaring yaitu CD21/CR2 [1]. Penyakit ini banyak ditemukan tersebar di negara-negara Asia Tenggara, China bagian selatan dan Hongkong. Prevalensi KNF di Indonesia mencapai 4,7 kasus/tahun/100.000 penduduk atau diperkirakan 7000–8000 kasus per tahun di seluruh Indonesia [2,3].

Prevalensi KNF yang cukup tinggi membutuhkan langkah penanggulangan dalam mengurangi prevalensi itu. Penanggulangan KNF sampai saat ini masih merupakan suatu masalah. Hal itu dikarenakan belum ditemukan vaksin yang sesuai dan efektif untuk menghambat perkembangan EBV. Selain karena nasofaring yang tersembunyi, KNF pada umumnya adalah penyakit yang tidak menunjukkan gejala sampai mencapai stadium lanjut, sehingga menyulitkan dalam diagnosis dan terapi. Maka diperlukan upaya pencegahan melalui vaksinasi yang efektif dan bersifat non toksik. Vaksinasi tersebut harus berasal dari bahan baku vaksin yang berkualitas, yaitu dengan perlunya dilakukan konstruksi pada vaksin EBV yang dapat mencakup semua *strain* virus tersebut [4]. Kandidat vaksin hasil konstruksi tersebut diharapkan dapat menyebabkan pembentukan antibodi dalam sistem kekebalan tubuh untuk melawan infeksi dari EBV.

Konstruksi vaksin terhadap KNF didasarkan pada protein permukaan EBV yang digunakan dalam menginfeksi melalui reseptor permukaan epitel nasofaring, yaitu gp350/220. Protein tersebut merupakan protein permukaan EBV yang memiliki 3 domain dengan epitop pengikatan reseptor CR2 dari epitel nasofaring yang terletak diantara domain 1 dan domain 2. Sekuens hasil konstruksi dari protein gp350/220 menunjukkan hanya terdapat 19 asam amino yang berperan dalam mekanisme infeksi pada epitel nasofaring, sekuens residu asam amino tersebut berada pada urutan ke-147 sampai 165 dari gp350/220 [5]. Hasil konstruksi vaksin itu kemudian diujikan pada hewan coba, baik secara *in vitro* maupun *in vivo*, sebelum digunakan sebagai vaksin pada manusia. Maka dari proses tersebut, penelitian ini dilakukan untuk melakukan pengujian secara *in vivo* dari kandidat vaksin tersebut pada ekspresi IgM, IgD dan IgA oleh sel B.

## METODE PENELITIAN

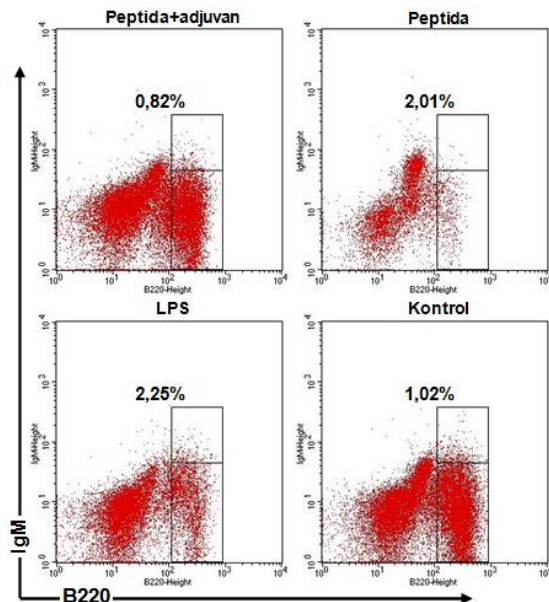
Hewan coba yang digunakan adalah mencit (*Mus musculus*) *strain* Balb/C. Pada perlakuan digunakan bayi dari hewan coba yang berumur 2 minggu dalam keadaan sehat dengan berat badan  $\pm 10$  gram tanpa membedakan jenis kelaminnya. Bayi mencit tersebut selama perlakuan dikondisikan masih satu kandang dengan induknya.

Peptida dari protein gp350/220 (EBV) disintesis dan dipurifikasi mencapai kemurnian 98,77% dengan konsentrasi 2,3 mg/ml. Adjuvan yang digunakan dalam salah satu perlakuan merupakan *Complete Freund's Adjuvant* (CFA), sebagai adjuvan pada injeksi inisiasi dari antigen dan *Incomplete Freund's Adjuvant* (IFA), sebagai adjuvan pada injeksi *booster*. Perlakuan dilakukan secara *in vivo* dengan empat jenis perlakuan, yaitu emulsi dari 50  $\mu\text{g}$  ( $\sim 22 \mu\text{l}$ ) peptida dan adjuvan (100  $\mu\text{l}$ ) (pept+); 50  $\mu\text{g}$  ( $\sim 22 \mu\text{l}$ ) peptida (pep), 40  $\mu\text{g}$  ( $\sim 20 \mu\text{l}$ ) Lipopolisakarida (LPS) dan kontrol. Setiap satu perlakuan diinjeksikan pada satu kelompok mencit, tapi pada perlakuan kontrol tidak dilakukan injeksi. Injeksi dilakukan secara subkutan pada kulit diatas punggung hewan coba.

Isolasi sel berinti tunggal dilakukan dengan dislokasi leher pada mencit, untuk mengambil organ *spleen*. Organ tersebut kemudian direndam dalam  $\pm 1$  ml PBS steril dan digerus dengan pangkal spuit. Hasil penggerusan disaring menggunakan *wire* steril dan homogenat dimasukkan pada tabung propilen steril. Tabung propilen tersebut disentrifus pada kecepatan 2500 rpm, 4°C selama 5 menit. Supernatan dibuang, dan pelet hasil sentrifus diresuspensi dengan 1 ml PBS dan suspensi *dipipetting*. Suspensi tersebut diambil 50  $\mu\text{l}$  dan dimasukkan pada *microtube* 1,5 ml yang telah berisi 300  $\mu\text{l}$  PBS. *Microtube* tersebut disentrifus pada kecepatan 2500 rpm, suhu 4°C selama 5 menit. Supernatan kemudian dibuang, dan pelet digunakan untuk pewarnaan *immunostaining*.

Pelet pada *microtube* ditambahkan *cytofix / cytoperm kit* (BD-Biosciences Pharmingen) terlebih dulu sesuai protokol produk, untuk membuat pori-pori pada sel. Setelah dicuci dan dipisahkan, pelet ditambahkan dengan 40  $\mu\text{l}$

pewarna antibodi spesifik. Tipe pewarnaan yang digunakan adalah pewarnaan *triple staining* dengan kombinasi dari 3 jenis antibodi spesifik dari *marker-marker* seluler yang akan dianalisis. Sel B dianalisis status dan kemampuannya memproduksi IgM, menggunakan antibodi monoklonal yaitu,

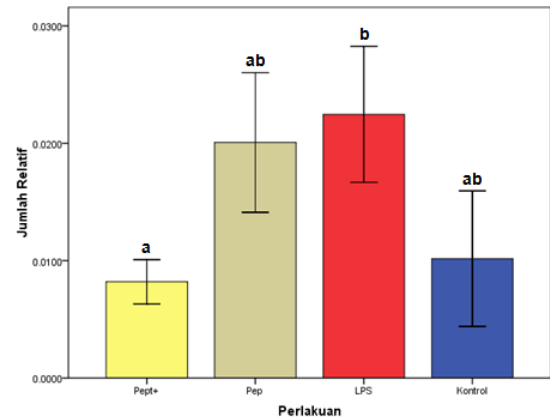


**Gambar 1.** Jumlah relatif stimulasi peptida sekuens spesifik gp350/220 pada sel B untuk mengekspresikan antibodi spesifik (IgM) yang ditunjukkan angka relatif dari total sel B pada setiap panel. Jumlah relatif tersebut dari setiap kelompok perlakuan dianalisis dengan *flowcytometry*. Perlakuan ditunjukkan pada setiap panel. Data adalah rata-rata  $\pm$  SD lima mencit pada setiap kelompok perlakuan.

*fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated*  $\alpha$ -mouse B220 (klon: RA3-6A2/Biolegend), *phycoerythrien (PE)-conjugated*  $\alpha$ -mouse CD4 (klon: GR1.5/Biolegend), *phycoerythrien-Cyanine dye 7 (PE-Cy7)-conjugated*  $\alpha$ -mouse IgM (klon: RMM-1/Biolegend). Status dan kemampuan sel B memproduksi IgD, dan IgA juga dianalisis menggunakan antibodi monoklonal yaitu, *fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated*  $\alpha$ -mouse B220 (klon: RA3-6A2 / Biolegend), *phycoerythrien (PE)-conjugated*  $\alpha$ -mouse IgD (klon: 11-26c.2a/Biolegend), *phycoerythrien-Cyanine dye 5 (PE-Cy5)-conjugated*  $\alpha$ -mouse IgM (klon: bs-0774R/BioSS).

Hasil pewarnaan *immunostaining* selanjutnya dimasukkan dalam kuvet

*flowcytometer* dan ditambahkan 400 $\mu$ l PBS steril. Kuvet dipasang pada *nozzle BD FACS Calibur™ flowcytometer*, dilakukan *setting* pada komputer dengan *softwareBD Cell Quest Pro™* (San Jose, CA) dan dilakukan koneksi dengan *flowcytometer (acquiring mode)*.



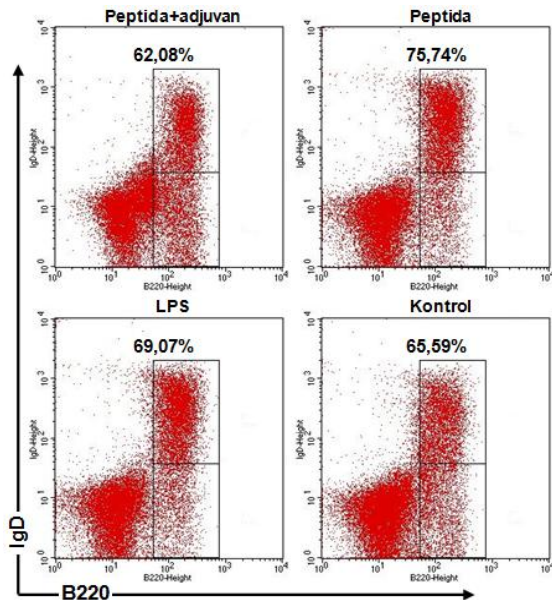
**Gambar 2.** Rata-rata ekspresi antibodi IgM pada setiap perlakuan. Data pada setiap kelompok perlakuan diwakili oleh lima mencit dengan standar deviasi yang ditunjukkan dengan notasi garis di setiap rata-rata (Pept+ = peptide+adjuvan, Pep = Peptida). Perbedaan notasi menunjukkan berbeda nyata.

Data dianalisis menggunakan permodelan dari hasil perhitungan sel B penghasil antibodi yang diamati dengan *softwareBD Cell Quest Pro™*. Data diuji statistik dengan uji normalitas, dan uji homogenitas varian. Data kemudian diuji dengan *one-way ANOVA* dengan nilai  $\alpha = 0,05$ . Kemudian dilakukan *Post-hoc test* dengan uji Tukey HSD (*Honestly Significant Difference*) untuk mengetahui perbedaannya, apabila hasil ANOVA menunjukkan hasil signifikan. Analisis data dilakukan dengan menggunakan program SPSS 16.0 for Windows.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

**Jumlah relatif ekspresi IgM pada sel B.** Hasil dari setiap perlakuan ditampilkan dengan nilai relatif dari keseluruhan sel B yang mampu mengekspresikan antibodi (IgM) yang terdapat pada sampel. Hasil injeksi peptida sekuens spesifik yang menjadi epitop EBV (Pep), menunjukkan hasil ekspresi antibodi IgM (2,01%) yang lebih tinggi dibandingkan dengan kontrol (1,02%) (Gambar 1).

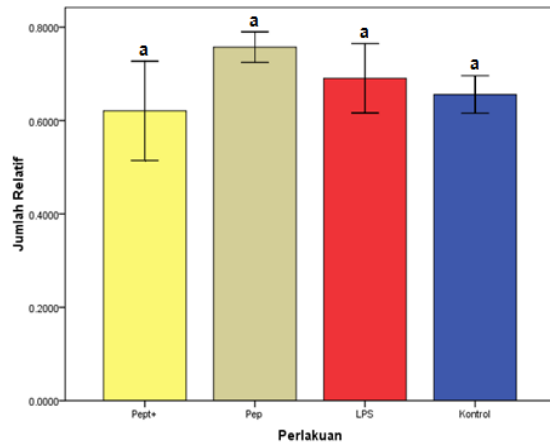
Peningkatan jumlah ekspresi antibodi IgM tersebut tidak signifikan dibandingkan dengan kontrol ( $p>0,05$ ) (Gambar 2). Hal tersebut dapat terjadi karena ketika sampel dipanen dan dianalisis tingkat ekspresi IgM sel B akibat injeksi peptida sekuens spesifik tersebut telah berkurang. Peran IgM sebagai antibodi primer



**Gambar 3.** Jumlah relatif stimulasi peptida sekuens spesifik gp350/220 pada sel B untuk mengekspresikan antibodi spesifik (IgD) yang ditunjukkan angka relatif dari total sel B pada setiap panel. Jumlah relatif tersebut dari setiap kelompok perlakuan dianalisis dengan *flowcytometry*. Perlakuan ditunjukkan pada setiap panel. Data adalah rata-rata  $\pm$  SD lima mencit pada setiap kelompok perlakuan.

yang mampu mendeteksi antigen asing untuk pertama kalinya dalam sirkulasi tubuh adalah salah satu faktor sehingga produksi IgM telah berkurang pada saat tersebut. Sedangkan, hasil ekspresi antibodi IgM pada injeksi Pept+ (0,82%) lebih rendah dibandingkan dengan kontrol (1,02%) (Gambar 1). Meskipun jumlah relatif yang lebih rendah, tapi nilai tersebut tidak berbeda nyata dibandingkan perlakuan kontrol ( $p>0,05$ ) (Gambar 2). Ekspresi yang lebih rendah itu dapat disebabkan oleh adanya ketidakseimbangan jumlah konsentrasi peptida dan adjuvan pada emulsi tersebut. Adjuvan yang digunakan dapat mengaktifkan sel T supresor positif Lyt-2. Sel T supresor itu dapat mengakibatkan penghambatan ekspresi IgM dari sel B, sehingga keberadaan peptida yang

terdapat pada emulsi tidak dapat meningkatkan ekspresi IgM pada perlakuan itu sebagai respon primer terhadap antigen [6].

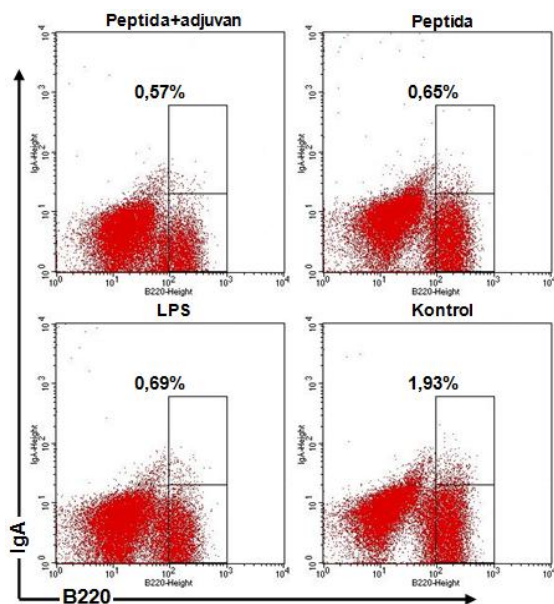


**Gambar 4.** Rata-rata ekspresi antibodi IgM pada setiap perlakuan. Data pada setiap kelompok perlakuan diwakili oleh lima mencit dengan standar deviasi yang ditunjukkan dengan notasi garis di setiap rata-rata (Pept+ = peptida+adjuvan, Pep = Peptida). Perbedaan notasi menunjukkan berbeda nyata.

**Jumlah relatif ekspresi IgD pada sel B.**

Hasil setiap perlakuan ditampilkan dengan nilai relatif dari keseluruhan sel B yang mampu mengekspresikan antibodi (IgD) yang terdapat pada sampel. Jumlah relatif ekspresi IgD pada perlakuan Pep (75,74%) memperlihatkan jumlah yang lebih tinggi dari kontrol (65,59%) (Gambar 3). Tapi, hasil produksi IgD menunjukkan bahwa antar perlakuan tidak terdapat perbedaan yang nyata ( $p>0,05$ ) (Gambar 4). Jumlah relatif sel B mengekspresikan IgD yang melebihi 50% dari total sel B menunjukkan bahwa sel B yang terdapat pada sampel tersebut masih banyak sel B yang belum terdiferensiasi oleh antigen. Selain karena umur hewan coba yang masih relatif muda, dapat juga karena jumlah antigen yang digunakan masih perlu untuk ditingkatkan. Analisis dari ekspresi antibodi yang dilakukan secara intraseluler juga dapat mengakibatkan mudahnya ekspresi IgD oleh sel B terdeteksi, karena IgD merupakan salah satu antibodi yang berperan sebagai reseptor permukaan bagi sel B yang belum terdiferensiasi, selain IgM. Rata-rata konsentrasi normal dari IgD yang terdapat pada serum hanya  $\pm$  0,04 mg/ml lebih sedikit dari IgM, yang juga reseptor permukaan sel B,

yaitu 1,5 mg/ml [7]. Jumlah antigen yang masih belum memenuhi kebutuhan untuk membuat sel B berdiferensiasi dapat terjadi salah satunya karena adanya ketidakseimbangan jumlah konsentrasi peptida dan adjuvan pada emulsi tersebut yang dapat menimbulkan efek “depot” atau antigen menjadi terlindungi oleh adjuvan [8]. Sehingga antigen yang telah berupa fragmen peptida, menjadi lebih sulit untuk dikenali secara langsung oleh reseptor pada sel-sel imunokompeten atau oleh IgM yang terdapat pada serum sebagai respon primer, dan mengurangi diferensiasi dari sel B.

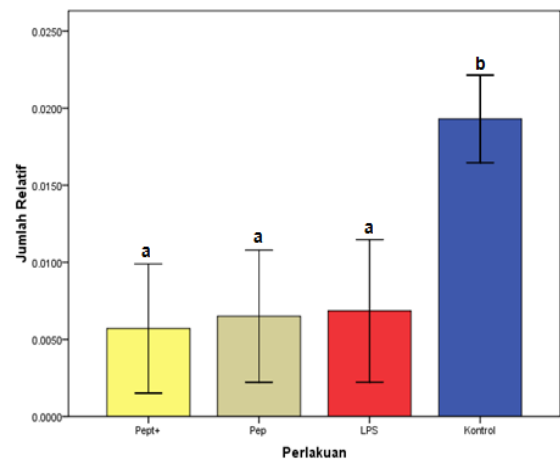


**Gambar 5.** Jumlah relatif stimulasi peptida sekuens spesifik gp350/220 pada sel B untuk mengekspresikan antibodi spesifik (IgA) yang ditunjukkan angka relatif dari total sel B pada setiap panel. Jumlah relatif tersebut dari setiap kelompok perlakuan dianalisis dengan *flowcytometry*. Perlakuan ditunjukkan pada setiap panel. Data adalah rata-rata ± SD lima mencit pada setiap kelompok perlakuan.

**Jumlah relatif ekspresi IgA pada Sel B.**

Hasil ekspresi antibodi (IgA) dari sel B di setiap perlakuan ditampilkan dengan nilai relatif dari keseluruhan sel B pada sampel. Jumlah relatif ekspresi IgA dari sel B antara perlakuan injeksi Pept+ (0,57%), Pep(0,65%), dan LPS (0,69%) lebih rendah dari ekspresi IgA kontrol (1,83%) (Gambar 5). Hasil

ekspresi IgA pada ketiga perlakuan berbeda signifikan dengan kontrol ( $p < 0,05$ ) (Gambar 6). Hal tersebut dapat terjadi karena adanya peningkatan konsentrasi IgG pada ketiga perlakuan injeksi tersebut. Konsentrasi IgG dapat menjadi salah satu agen supresi bagi produksi IgA yang tidak mengalami galaktosilasi [8]. Selain itu, analisis dari ekspresi antibodi yang dilakukan secara intraseluler juga dapat mengakibatkan rendahnya deteksi ekspresi IgA pada sel B. Antibodi IgA pada umumnya memiliki peran sebagai antibodi netralisasi, yaitu dalam menghambat toksin bakteri untuk menginfeksi sel [7].



**Gambar 6.** Rata-rata produksi antibodi IgA pada setiap perlakuan. Data pada setiap kelompok perlakuan diwakili oleh lima mencit dengan standar deviasi yang ditunjukkan dengan notasi garis di setiap rata-rata (Pept+ = peptida+adjuvan, Pep = Peptida). Perbedaan notasi menunjukkan berbeda nyata.

**KESIMPULAN**

Pengujian secara *in vivo* terhadap peptida sekuens spesifik epitop gp350/220 tidak mampu meningkatkan ekspresi antibodi IgM secara signifikan dibandingkan dengan kontrol yang tidak diberikan perlakuan. Ekspresi antibodi IgD menunjukkan masih banyak sel B yang belum terdiferensiasi oleh antigen dan tidak ada perbedaan antar keempat perlakuan. Peptida tersebut menunjukkan ekspresi antibodi IgA lebih rendah terhadap ekspresi IgA kontrol.

#### DAFTAR PUSTAKA

- [1] Korcum, A.F., E. Ozyar, and A. Eyhan(2006), Epstein Barr Virus Genes and Nasopharengeal Cancer. *Turkish Journal of Center* **36**(3), 97-103.
- [2] Brennan, B. (2006) Nasopharyngeal Carcinoma. *Review in Orphanet Journal in Rare Disease*, Biomed Central.
- [3] Lee, A.W., W. Foo, O. Mang, W.M. Sze, R. Chappell, W.H. Lau, and W.M. Ko(2003), Changing epidemiology of nasopharyngeal carcinoma in Hongkong over a 20 year period (1980-1999): an encouraging reduction in both incidence and mortality. *Int J Cancer* **103**(5), 680-685.
- [4] Pazdur, Mary P., and J.L. Jones (2007), Vaccines: an innovative approach to treating cancer. *Journal of Infusion Nursing* **30**(3), 173–178.
- [5] Sitompul, Loly Sabrina, Nashi Widodo, M. Sasmito D., and Didik Y.U. (2012), Epitope Mapping of gp350/220 Conserved Domain of Epstein Barr Virus to Develop Nasopharyngeal Carcinoma (NPC) Vaccine. *Bioinformation* **8**(10),479-482.
- [6] Lowy, I., Leclercq L, and Theze J (1985), Regulation of IgM expression by adjuvant activated splenic suppressor T cells. *Cell Immunol J* **94**(2), 609-613.
- [7] Murphy, K., P. Travers & M. Walport (2008), *Janeway's Immunobiology*. Garland Science, Taylor & Francis Group, LLC, New York.
- [8] O'Hagan, D.T. (2000). *Vaccine adjuvants*. Humana Press, Inc. New Jersey, USA.