

**PEMURNIAN *SINGLE CHAIN FRAGMENT VARIABLE*
ANTIBODI ANTI NS1 VIRUS DENGUE SEROTIPE 2
SEBAGAI KOMPONEN KIT DETEKSI**

SKRIPSI

**AYU AGUSTINA PUTRI UTAMI
A 161 081**



**SEKOLAH TINGGI FARMASI INDONESIA
YAYASAN HAZANAH
BANDUNG
2020**

**PEMURNIAN *SINGLE CHAIN FRAGMENT VARIABLE*
ANTIBODI ANTI NS1 VIRUS DENGUE SEROTIPE 2
SEBAGAI KOMPONEN KIT DETEKSI**

SKRIPSI

Sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Farmasi

**AYU AGUSTINA PUTRI UTAMI
A161081**



**SEKOLAH TINGGI FARMASI INDONESIA
YAYASAN HAZANAH
BANDUNG
2020**

**PEMURNIAN *SINGLE CHAIN FRAGMENT VARIABLE* ANTIBODI ANTI
NS1 VIRUS DENGUE SEROTIPE 2 SEBAGAI KOMPONEN KIT
DETEKSI**

**AYU AGUSTINA PUTRI UTAMI
A161081**

November 2020

Disetujui Oleh :

Pembimbing

Pembimbing

apt. Dewi Astriany, M.Si.

Shinta Kusumawardani, M.Si.

Kutipan atau saduran baik sebagian ataupun seluruh naskah, harus menyebut nama pengarang dan sumber aslinya, yaitu Sekolah Tinggi Farmasi Indonesia.

Skripsi ini adalah persembahan kecil untuk kedua orang tua saya. Pembimbing privat (fisnandya), ade (aurel, akbar), orang teristimewa (rifqi), best friend (bilal, anti, mbul, afri, yola, ica, agita, nurafifah, riri, iman), partner penelitian (sherlynda, elina). Pencapaian ini adalah persembahan istimewa saya untuk mereka semua. Terima kasih

ABSTRAK

DBD merupakan penyakit infeksi yang disebabkan oleh virus dengue. Gejala awal infeksi virus dengue tidak khas sehingga sering terjadi keterlambatan diagnosis. Protein NS1 merupakan glikoprotein yang disekresikan oleh sel yang terinfeksi oleh virus dan mampu dideteksi sejak hari pertama infeksi virus dengue terjadi. *Single chain Fragment variable* adalah bagian dari antibodi yang memiliki sifat yang sama dengan antibodi keseluruhan karena scFv merupakan tempat terikatnya antigen pada antibodi. Salah satu fragmen antibodi yang dikembangkan untuk mendeteksi antigen virus dengue adalah scFv anti NS1. ScFv dapat diproduksi menggunakan sistem bakteri *Escherichia coli*, karena mudah diperbanyak dan siklus hidupnya sederhana. Pemurnian scFv hasil produksi mempunyai peranan penting untuk memperoleh scFv murni dalam jumlah yang memadai untuk digunakan sebagai fragmen antibodi pada komponen kit diagnostik. Tujuan penelitian ini adalah melakukan proses purifikasi scFv anti NS1 hasil produksi menggunakan teknik kromatografi afinitas dengan berbagai variasi imidazol bufer elusi yaitu 300 mM, 400 mM dan 500 mM. Konsentrasi imidazol 300 mM dengan metode *magnetic beads* dipilih sebagai konsentrasi optimum pada pemurnian scFv dilihat dari keberadaan pita protein scFv yang lebih tebal dibandingkan dengan menggunakan metode kolom Ni-NTA.

Kata kunci : *single chain Fragment variable* (scFv), NS1, dengue, purifikasi, imidazol

ABSTRACT

DHF is an infection disease caused by the dengue virus. Early symptoms of infection dengue virus are not specific, so resulting frequently delays in diagnosis. NS1 protein is a glycoprotein secreted by cells infected by a virus and can be detected since first day of dengue virus infection. The single chain Fragment variable part of the antibody which has the same total properties antibody because scFv is the place antigen binds to the antibody. Which one of the antibody fragments developed to detect dengue virus antigen is scFv anti NS1. ScFv is produced using bacteria Escherichia coli system, because it is easy to propagate and simply life cycle. Purification to produced scFv has an important part in determining the presence of pure scFv in sufficient quantities for use as an antibody fragment in diagnostic components kit. Research purposes was to purify the anti-NS1 scFv product using affinity chromatography techniques with various variations of elution buffer imidazol, namely 300 mM, 400 mM and 500 mM. The concentration of imidazol 300 mM using the magnetic beads method was chosen as the optimal concentration in the scFv purification seen from the presence of thicker scFv protein bands compared to using the Ni-NTA column method.

Keywords : *single chain Fragment variable (scFv), NS1, dengue, purification, imidazol*

KATA PENGANTAR

Bismillahirrahmanirrahim,

Puji dan syukur penulis panjatkan ke hadirat Allah SWT atas segala berkah rahmat dan ridho-Nya penulis dapat menyelesaikan penelitian dan penulisan skripsi yang berjudul “**Pemurnian *Single Chain Fragment Variable* Antibodi Anti NS1 Virus Dengue Serotipe 2 Sebagai Komponen Kit Deteksi**”.

Penelitian dan penulisan skripsi ini dilakukan untuk memenuhi salah satu syarat untuk mendapatkan gelar sarjana pada program studi sarjana Farmasi Sekolah Tinggi Farmasi Indonesia.

Penulis mengucapkan terima kasih kepada dosen pembimbing ibu apt. Dewi Astriany, M.Si. dan ibu Shinta Kusumawardani, M.Si. atas bimbingan, nasihat, dukungan serta pengorbanan yang diberikan. Pada kesempatan ini, tidak lupa penulis mengucapkan terima kasih yang sebesar – besarnya kepada :

1. Dr. apt. Adang Firmansyah, M.Si, selaku Ketua Sekolah Tinggi Farmasi Indonesia,
2. apt. Revika Rachmaniar, M.Farm, selaku Ketua Program Studi Sarjana Farmasi,
3. apt. Dewi Astriany, M.Si, selaku Dosen Wali yang telah banyak memberikan bimbingan dan arahan kepada penulis,
4. Seluruh staf dosen, staf administrasi serta karyawan Sekolah Tinggi Farmasi Indonesia,
5. Papah, Mamah, Akbar, Aurel yang telah memberi semangat, doa dan cinta serta menemani penulis disaat-saat sulit selama penelitian dan penyusunan skripsi.
6. Serta sahabat-sahabat seperjuangan angkatan 2016 yang telah memberikan inspirasi dan kegembiraan selama penulis kuliah di Sekolah Tinggi Farmasi Indonesia.
7. Rekan-rekan mahasiswa Reguler pagi C 2016 dan akang teteh di pusat riset yang telah memberikan motivasi, doa, ilmu dan dukungan selama melakukan penelitian hingga penyusunan skripsi ini selesai.

8. Seluruh pihak yang tidak dapat disebutkan satu-persatu yang telah memberikan bantuan hingga terselesaikannya skripsi ini.

Dalam penyusunan skripsi ini masih banyak kesalahan dan kekurangan karena pengetahuan yang masih sangat terbatas. Oleh karena itu, dengan segala kerendahan hati diharapkan masukan berupa kritik dan saran yang bersifat membangun untuk perbaikan di masa yang akan datang. Penulis berharap semoga tugas akhir ini akan memberikan manfaat bagi penulis sendiri dan juga bagi pihak lain yang berkepentingan.

Bandung, November 2020

Penulis

DAFTAR ISI

LEMBAR PENGESAHAN	i
KUTIPAN	ii
LEMBAR PERSEMBAHAN	iii
ABSTRAK	iv
ABSTRACT	v
KATA PENGANTAR	vi
DAFTAR ISI	viii
DAFTAR TABEL	xi
DAFTAR GAMBAR	xii
DAFTAR LAMPIRAN	xiiiv
BAB I PENDAHULUAN	1
1.1. Latar Belakang	1
1.2. Identifikasi Masalah	3
1.3. Tujuan Penelitian	3
1.4. Kegunaan Penelitian	3
1.5. Waktu dan Tempat Penelitian	3
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	4
2.1. Demam Berdarah Dengue	4
2.1.1. Patofisiologi Demam Berdarah Dengue	5
2.1.2. Patogenesis Demam Berdarah Dengue	5
2.2. Virus Dengue	6
2.3. Antigen dan Antibodi	7
2.4. Protein NS1 Virus Dengue.....	8
2.5. <i>Single Chain Fragment Variable</i> (scFv).....	8

2.6. Plasmid.....	9
2.7. Elektroforesis	10
2.8. SDS-PAGE	11
2.9. Kromatografi Afinitas	11
BAB III ALAT, BAHAN DAN METODE PENELITIAN.....	14
3.1. Alat Penelitian.....	14
3.2. Bahan Penelitian	14
3.3. Metode Penelitian	15
3.3.1. Pembuatan <i>Pre-culture</i>	15
3.3.2. Pembuatan Kultur scFv	15
3.3.3. Ekspresi scFv Rekombinan	15
3.3.4. Pemurnian scFv	16
A. Optimasi Pemurnian Menggunakan <i>Magnetic Beads</i> ..	16
B. Pemurnian Menggunakan Kolom Ni-NTA	16
3.3.5. SDS-PAGE	17
3.3.6. Pewarnaan Gel Dengan <i>Silver stain</i>	18
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN	19
4.1. Pembuatan <i>Pre-culture</i>	19
4.2. Pembuatan Kultur scFv	20
4.3. Ekspresi scFv Rekombinan	21
4.4. Pemurnian scFv	28
4.4.1. Optimasi Pemurnian Menggunakan <i>Magnetic Beads</i>	23
4.4.2. Pemurnian Menggunakan Kolom Ni-NTA	23
4.5. SDS-PAGE	30
4.6. Pewarnaan Gel Dengan <i>Silver stain</i>	33

BAB V	SIMPULAN DAN ALUR PENELITIAN SELANJUTNYA	38
	5.1. Simpulan	38
	5.2. Alur Penelitian Selanjutnya	38
	DAFTAR PUSTAKA	39
	LAMPIRAN.....	41

DAFTAR TABEL

Tabel 4.1 Interpretasi Keberadaan scFv Pada SDS-PAGE Dalam Media LB.....	20
Tabel 4.2 Bobot pelet Hasil Sentrifugasi Skala 10 mL.....	21
Tabel 4.3 Bobot pelet Hasil Sentrifugasi Skala 250 mL.....	22

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2. 1	Model antibodi dan bagian ScFv yang terdiri dari <i>variable heavy</i> (VH) dan <i>variable</i> (VL) yang dihubungkan oleh peptida fleksibel	9
Gambar 2.2	Peta Plasmid pET-21b.....	10
Gambar 4.1	Visualisasi SDS-PAGE media LB skala 10 mL suhu 28 °C penginduksi IPTG 0,5 mM pada <i>falcon</i> 1 dan <i>falcon</i> 2. Keterangan: S2: setelah induksi, S3: supernatan setelah sentrifugasi, S4: setelah sonikasi, SS: supernatan hasil sonikasi yang disentrifugasi, SS1: sampling SS	23
Gambar 4.2	Visualisasi SDS-PAGE media LB skala 10 mL suhu 28 °C penginduksi IPTG 0,5 mM pada <i>falcon</i> 2 dan <i>falcon</i> 3. Keterangan: S2: setelah induksi, S3: supernatan setelah sentrifugasi, S4: setelah sonikasi, SS: supernatan hasil sonikasi yang disentrifugasi, SS1: sampling SS	24
Gambar 4.3	Visualisasi SDS-PAGE media LB skala 250 mL suhu 28 °C penginduksi IPTG 0,5 mM. Keterangan: S1: Kultur setelah OD tercapai S2: setelah induksi, S3: supernatan setelah sentrifugasi, S4: setelah sonikasi, SS: supernatan hasil sonikasi yang disentrifugasi	25
Gambar 4.4	Visualisasi SDS-PAGE media LB skala 250 mL suhu 28 °C penginduksi IPTG 0,5 mM. Keterangan: SS: supernatan hasil sonikasi yang disentrifugasi.....	26
Gambar 4.5	Visualisasi SDS-PAGE Origami B(DE3) media LB skala 10 mL suhu 28 °C penginduksi IPTG 0,5 mM. Keterangan: S1: Kultur setelah OD tercapai S2: setelah induksi, S3: supernatan setelah sentrifugasi, S4: setelah sonikasi, SS: supernatan hasil sonikasi yang disentrifugasi.....	27
Gambar 4.6	Visualisasi SDS-PAGE Origami B(DE3) media LB skala 10 mL suhu 28 °C penginduksi IPTG 0,5 mM.....	27

- Gambar 4.7 Visualisasi SDS-PAGE setelah proses purifikasi menggunakan *magnetic beads* dengan pewarnaan gel CBB media LB skala 10 mL suhu 28 °C penginduksi IPTG 0,5 mM. Keterangan: *Flow Through* (FT): sampel setelah inkubasi 18 jam W1: sampel dengan penambahan *washing buffer* 1 W2: sampel dengan penambahan *washing buffer* 2 E1: sampel dengan penambahan *elution buffer* 1 E2: sampel dengan penambahan *elution buffer* 2 30
- Gambar 4.8 Visualisasi SDS-PAGE setelah proses purifikasi menggunakan *magnetic beads* dengan pewarnaan gel CBB media LB skala 10 mL suhu 28 °C penginduksi IPTG 0,5 mM. Keterangan: *Flow Through* (FT): sampel setelah inkubasi 18 jam W1: sampel dengan penambahan *washing buffer* 1 W2: sampel dengan penambahan *washing buffer* 2 E1: sampel dengan penambahan *elution buffer* 1 E2: sampel dengan penambahan *elution buffer* 2 31
- Gambar 4.9 Visualisasi SDS-PAGE setelah proses purifikasi menggunakan kolom Ni-NTA dengan pewarnaan gel CBB media LB skala 250 mL suhu 28 °C penginduksi IPTG 0,5 mM. Keterangan: FT : sampel setelah inkubasi 18 jam W1: sampel dengan penambahan *washing buffer* 1 W2: sampel dengan penambahan *washing buffer* 2 32
- Gambar 4.10 Visualisasi SDS-PAGE setelah proses purifikasi menggunakan kolom Ni-NTA dengan pewarnaan gel CBB media LB skala 250 mL suhu 28 °C penginduksi IPTG 0,5 mM. Keterangan: E1: sampel dengan penambahan *elution buffer* 1 E2: sampel dengan penambahan *elution buffer* 2 32
- Gambar 4.11 Visualisasi SDS-PAGE setelah proses purifikasi menggunakan *magnetic beads* dengan pewarnaan gel *silver stain* media LB skala 10 mL suhu 28 °C penginduksi IPTG 0,5 mM. Keterangan: *Flow Through* (FT) : sampel setelah inkubasi 18 jam W1: sampel dengan penambahan *washing buffer* 1 W2: sampel dengan penambahan *washing buffer* 2 E1: sampel dengan penambahan *elution buffer* 1 E2: sampel dengan penambahan *elution buffer* 2 33

- Gambar 4.12 Visualisasi SDS-PAGE setelah proses purifikasi menggunakan *magnetic beads* dengan pewarnaan gel *silver stain* media LB skala 10 mL suhu 28 °C penginduksi IPTG 0,5 mM. Keterangan: *Flow Through* (FT) : sampel setelah inkubasi 18 jam W1: sampel dengan penambahan *washing buffer* 1 W2: sampel dengan penambahan *washing buffer* 2 E1: sampel dengan penambahan *elution buffer* 1 E2: sampel dengan penambahan *elution buffer* 2 34
- Gambar 4.13 Visualisasi SDS-PAGE setelah proses purifikasi menggunakan kolom Ni-NTA dengan pewarnaan gel *silver stain* media LB skala 250 mL suhu 28 °C penginduksi IPTG 0,5 mM. Keterangan: *Flow Through* (FT) : sampel setelah inkubasi 18 jam W1: sampel dengan penambahan *washing buffer* 1 W2: sampel dengan penambahan *washing buffer* 2..... 35
- Gambar 4.14 Visualisasi SDS-PAGE setelah proses purifikasi menggunakan kolom Ni-NTA dengan pewarnaan gel *silver stain* media LB skala 250 mL suhu 28 °C penginduksi IPTG 0,5 mM. Keterangan: E1: sampel dengan penambahan *elution buffer* 1 E2: sampel dengan penambahan *elution buffer* 2..... 36

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1 Alur Penelitian	41
Lampiran 2 <i>Marker Standar Protein Dual Color</i>	42
Lampiran 3 <i>Marker Thermo scientific</i>	43
Lampiran 4 Pembuatan Media Dan Larutan	44
Lampiran 5 Pembuatan Larutan Pemurnian.....	48
Lampiran 6 Bobot <i>Pellet</i> Dan Penambahan <i>Phosphate Buffer Saline</i>	50

DAFTAR PUSTAKA

- Ahmad, Z.A *et al.* 2012. "SCFV Antibody: Principles and Clinical Application." *Clinical and Developmental Immunology Volume 2012*. Hindawi Publishing Corporation. Doi/10.1155/2012/980250.
- Alwi, I., Setiyohadi, B., dan Sudoyo, A. W. 2006. *Buku Ajar Ilmu Penyakit Dalam*, edisi 5. Jakarta: Interna Publishing. Hal. 1709 – 1713.
- Amersham Pharmacia Biotech. 2000. *Protein Purification Hand Book*. New York: Amersham Pharmacia Biotec. P. 10-20.
- Ansel, H. C. 2005. *Pengantar Bentuk Sediaan Farmasi*, edisi keempat. Jakarta: Universitas Indonesia Press.
- Bessoff, K., Beltran, M., Vergne E, Hunsperger E. 2007. "Evaluation of a commercial NS-1 antigen capture ELISA for the diagnosis of acute dengue infection." *Am J Trop Meh Hyg* 77(5): 217-218.
- Bratawidjaya, K. G dan Rengganis, I. 2012. *Imunologi Dasar*, edisi 10. Jakarta: Badan Penerbit Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia. Hal. 469 – 475.
- Candra, A. 2010. *Demam berdarah Dengue : Epidemiologi, Patogenesis, dan Faktor Risiko Penularan*. Aspirator Volume 2 (2): Hal. 110 - 119.
- Dussart, P., Labeau, B., and Lagathu, G. 2006. "Evaluation of an enzyme immunoassay for detection of dengue virus NS1 antigen in human serum". *Clin Vaccine Immunol* 13. P. 9 - 1185.
- Fulcrand, G., Dages, S., Zhi, X., Chapagain, P., Gerstman, B.S., Dunlap, D. and Leng, F. 2016. *A critical signal regulating the basal expression of the lac operon in Escherichia coli*. Scientific Reports. P. 1-12.
- Gorke, B and J. Stulke. 2008. "Carbon catabolite repression in bacteria: Many ways to make the most out of nutrients". *Nature Reviews Microbiology*, 6 (8): 613.
- Hadinegoro, S. Sri., Rezeki. 2011. *Tata Laksana Demam Berdarah Dengue di Indonesia*, edisi ketiga. Jakarta: Departemen Kesehatan Republik Indonesia.
- Hage, D.S. 2005. *Handbook of Affinity Chromatography*, 2nd ed. Boca Raton: CRC Press. P. 593.
- Hansen, L. H., Knudsen, S., and Sorensen, S. J. 1998. "The effect of the lac Y gene on the induction of IPTG inducible promoters, studied in *Escherichia coli* and *Pseudomonas fluorescens*". *Cur Microbiology*,36 (6): 341-347.

- Hastuti, O. 2008. *Demam Berdarah Dengue Penyakit dan Cara Pencegahannya*. Yogyakarta : Kanisius.
- Hemes, B.D. 1998. *Gel Electrophoresis of Proteins*. New York: Oxford University Press.
- Sumampouw, O. J. 2017. *Pemberantasan Penyakit Menular*. Yogyakarta : Deepublish.
- Losen, M., Frolich, B., Pohl, M., and Buchs, J. 2004. "Effect of oxygen limitation and medium composition on *Escherichia coli* fermentation in shake-flask cultures". *Biotechnol, Prog* (20): 1062-1068.
- Noor, R.I., Aryati., dan Wardhani, P. 2011. "Keterkaitan Antigen NS1 Infeksi Virus Dengue dengan Serotipe Virus Dengue." *Indonesian Association of Clinical Pathologist* 18(2): 77-75.
- Pennington, S. R and Dunn, M. J. 2001. *Proteomics From Protein Sequence To Function*. New York: BIOS Scientific Publishers
- Prihanto, A.A dan Jaziri, A.A . 2019. *Bioteknologi Perikanan Dan Kelautan*. Malang: UB Press. Hal 129-130.
- Rubiyanto, D. 2017. *Metode Kromatografi Prinsip Dasar, Praktikum dan Pendekatan Pembelajaran Kromatografi*. Yogyakarta: Deepublish.
- Satari, H. I., dan Meiliasari, M. 2004. *Demam Berdarah*. Jakarta : Puspa Swara.
- Sezonov, G., Joseleau, D., and D'ari, R. 2007. "*Escherichia coli* Physiology in Luria-Bertani Broth". *Journal of Bacteriology* 189 (23): 8746-8749.
- Soegijanto, S. 2005. *Patogenesis dan Perubahan Patofisiologi Infeksi Virus Dengue*. Surabaya: Airlangga University Press.
- Staf Pengajar Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia. 1993. *Mikrobiologi Kedokteran*. Jakarta: Binarupa Aksara.
- Sudjadi. 2008. *Bioteknologi Kesehatan*. Yogyakarta : Kanisius.
- Sukowati, S. 2010. *Masalah Vektor Demam Berdarah Dengue dan Pengendaliannya di Indonesia*, Vol 2. Buletin Jendela Epidemiologi.
- Walker, John. M. 2002. *The Protein Protocols Handbook*, ed 6. New Jersey: Humana Press
- Westermeier, R. 2016. *Electrophoresis in practice : a guide to theory and practice*, ed 5. New Jersey: John Wiley & Sons Inc.
- World Health Organization. 2004. *Pencegahan dan Pengendalian Dengue dan Demam Berdarah Dengue*. Jakarta : Penerbit Buku Kedokteran EGC.