

SOYASAPONIN I SEBAGAI ADJUVAN UNTUK MENINGKATKAN IMUNOGENISITAS VAKSIN INFLUENZA BERBASIS EPITOP M2e

Idar Idar^{a*}, Toto Subroto^b & Soetijoso Soemitro^b

^a Sekolah Tinggi farmasi Bandung, Jl. Soekarno Hatta No. 754 Bandung

^b Departemen Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Padjadjaran, Jl. Raya Bandung-Sumedang Km. 21

*Alamat Korespondensi: idar.icemetz@gmail.com

Abstrak: Indonesia menempati urutan pertama di dunia dalam kasus infeksi flu burung. Vaksin flu burung yang beredar saat ini masih berbasis hemagglutinin (HA) dan Neuraminidase (NA) yang mudah mengalami mutasi. Untuk mengatasi hal tersebut, dikembangkan vaksin influenza universal yang berbasis epitop virus influenza yang lestari yaitu M2e. Namun diperlukan adjuvan untuk meningkatkan imunogenisitas M2e. Soyasaponin adalah salah satu jenis saponin yang berpotensi dikembangkan sebagai adjuvan. Dalam penelitian ini, digunakan epitop M2e yang telah dimodifikasi, M2e2-16-K-P25 dan soyasaponin I sebagai adjuvannya. Efektivitas vaksin diuji terhadap mencit galur BALB/c. Respon antibodi M2e yang dihasilkan pada serum mencit diukur dengan ELISA Berdasarkan penelitian ini, soyasaponin I terbukti dapat meningkatkan imunogenisitas epitop M2e2-16-K-P25 dengan cukup baik.

Kata kunci: Adjuvan, Soyasaponin I, M2e2-16-K-P25, vaksin influenza universal, hemagglutinin, neuramidase.

Abstract: Indonesia has the highest avian influenza cases. Current avian influenza vaccine still based on hemagglutinin (HA) and Neuraminidase (NA) which is prone to mutation. To overcome this problem, universal influenza vaccine based on highly conserved influenza virus epitope, M2e, was developed. However, adjuvant was needed to improve M2e immunogenicity. Soyasaponin is a potential adjuvant. In this study, modified M2e, M2e2-16-K-P25 and soyasaponin I were used as epitope and adjuvant, respectively. Effectiveness of vaccine were tested against BALB/c mice and M2e antibody generated in the serum were measured by ELISA. The result was soyasaponin I enhance the immunogenicity of M2e2-16-K-P25 epitope.

Keywords: Adjuvant, Soyasaponin I, M2e2-16-K-P25, universal influenza vaccine, hemagglutinin, neuramidase

PENDAHULUAN

Indonesia menempati urutan pertama di dunia dalam kasus infeksi flu burung. Berdasarkan data kumulatif dari 15 negara yang dikumpulkan oleh WHO sejak tahun 2003 sampai dengan 2012, sekitar 31,19% (178 kasus dari total 564 kasus di 15 negara) terjadi di Indonesia. Tingkat kematiannya pun paling tinggi di dunia, yakni 157 kematian dari 178 kasus flu burung atau sebesar 83,07% (WHO, 2012).

Sampai saat ini, haemagglutinin (HA) dan neuraminidase (NA) masih menjadi target vaksin influenza. HA dan NA merupakan protein virus influenza yang membantu menyerang respons kekebalan. Namun, HA dan NA ini secara terus-menerus mengalami mutasi (Carrat & Flahault, 2007), sehingga diperlukan vaksin baru jika terbentuk strain virus baru.

Untuk mengatasi kelemahan vaksin konvensional, dirancanglah vaksin influenza universal yang berbasis epitop. Epitop tersebut dikenal sebagai M2e yaitu protein matriks 2 (M2) mengandung satu ektodomain kecil pada ujung-N. M2e ini memiliki urutan asam amino bersifat lestari pada semua virus influenza (Fiers *et al.*, 2004).

Namun, epitop ini tidak cukup besar untuk membangkitkan respon kekebalan tubuh, sehingga dalam penggunaan sebagai vaksin selalu diformulasikan bersama dengan adjuvan. Sampai saat

ini adjuvan yang telah mendapatkan lisensi WHO masih sangat sedikit. Aluminium hidroksida gel (Alhidrogel) adalah salah satu adjuvan yang telah mendapat lisensi WHO dan tersedia secara komersial. Namun, adjuvan alhidrogel memiliki berbagai kelemahan yaitu: tidak dapat menstimulasi respon sel T termasuk limfosit sel T, potensi adjuvannya hilang ketika dibekukan, dan menyebabkan granuloma pada daerah penyuntikkan (Reed *et al.*, 2008). Berdasarkan hal tersebut diperlukan penelitian dan pengembangan lebih mendalam untuk mencari dan mendapatkan adjuvan yang dapat mengatasi kelemahan alhidrogel.

Saponin adalah senyawa yang banyak ditemukan dalam berbagai tumbuhan di alam. Berbagai jenis saponin, salah satunya soyasaponin yang berasal dari kedelai, telah diketahui berpotensi digunakan sebagai adjuvan. Secara umum, saponin memiliki efek hemolisis yang cukup besar. Namun, soyasaponin memiliki efek hemolisis yang kecil dibanding saponin dari sumber lainnya (Sun *et al.*, 2009; Oda *et al.*, 2003).

Pada penelitian ini akan dilakukan formulasi M2e dengan soyasaponin sebagai adjuvannya. Efektivitas soyasaponin sebagai adjuvan akan diuji secara *in vivo* pada mencit khusus, galur BALB/c. Titer antibodi yang dihasilkan pada serum mencit diukur dengan menggunakan metode ELISA yang dioptimasi terlebih dahulu.

BAHAN DAN METODE

Bahan

Mencit galur BALB/c (Bio Farma), epitop M2e2-16-K-P25 (disintesis oleh GL Biochem Shanghai Ltd.), natrium klorida (Sigma Aldrich), alhidrogel, kalium dihidrogen fosfat (Merck), Dikalium hidrogen fosfat (Merck), bovine serum albumin (Merck), M2e standar (antibodies.com online), *goat peroxidase label anti mouse IgG* (antibodies.com online), tetrametilbenzidine/TMB (Sigma Aldrich), Tween-20 (Sigma Aldrich), asam sulfat (Merck).

Metode

Formulasi kandidat vaksin

Sebanyak 20 nmol epitop M2e2-16-K-P25 diformulasikan dengan soyasaponin I dengan konsentrasi yang sama.

Kemudian sebagai pembanding, 20 nmol epitop M2e2-16-K-P25 diformulasikan dengan 100 µg alhidrogel.

Imunisasi

Vaksin hasil formulasi dinokulasi pada mencit betina galur BALB/c secara subkutan (penyuntikkan yang dilakukan dibawah lapisan kulit). Setiap vaksin diinokulasikan pada 5 ekor mencit. Kemudian dilakukan pengulangan inokulasi pada hari ke-14 dengan menggunakan vaksin yang sama. Sebagai pembanding, masing-masing adjuvan diinokulasikan pada mencit galur yang sama.

Pengambilan darah dan pemisahan serum

Darah mencit diambil pada hari ke-25. Mencit dialiri gas CO₂ beberapa detik sampai tidak sadar, tetapi jangan sampai mati. Kemudian darah mencit diambil melalui mata (*orbital sinus or plexus/ retro-orbital blood collection*) (Parasuraman, *et al.*, 2010; Hoff, 2000) dan ditampung ke dalam tabung mikro 1,5 mL. Setelah itu dilakukan eutanasia pada mencit dengan cara dislokasi serviks.

Darah mencit yang baru diambil, dibiarkan pada suhu ruang selama 45 menit. Kemudian dilakukan sentrifugasi pada kecepatan 1800 rpm, suhu 4°C, selama 15 menit dengan kondisi rem (*brake*) alat sentrifuga dimatikan. Kemudian serum yang berupa cairan bening kekuningan diambil secara hati-hati menggunakan mikropipet dan ditempatkan pada tabung mikro yang baru.

Penentuan titer antibodi

Pengujian titer antibodi dilakukan menggunakan ELISA tipe *indirect*. Prosedur pengujian ELISA berdasarkan Denis *et al.* (2008) dan Nikbakht *et al.* (2012) dengan beberapa penyesuaian dan optimasi menggunakan titrasi checkerboard. Sebanyak 100 µl peptida M2e dilapiskan pada 96-well Immuno Plate selama semalaman. Kemudian dilakukan pencucian sebanyak 3 x 300 µl menggunakan bufer pencuci (0,05% Tween-20 dalam PBS). Kemudian untuk memblok plat yang tidak terlapisi oleh M2e

ditambahkan 150 µl *buffer blocking* (2% BSA, 1% Tween-20 dalam PBS). Setelah dilakukan pencucian, ditambahkan 100 µl sampel dan di inkubasi selama 1 jam pada suhu 37°C. Kemudian dicuci kembali menggunakan bufer pencuci sebanyak 3 x 300 µl. Setelah itu ditambah 100 µl *peroxidase labeled goat anti mouse IgG* dan di inkubasi selama 30 menit pada suhu 37°C. Kemudian plat dicuci kembali, dan ditambahkan 100 µl substrat tetrametilbenzidine dengan di inkubasi selama 15 menit pada suhu ruang. Untuk menghentikan reaksi ditambahkan 100 µl H₂SO₄ 2M, lalu di ukur absorbansinya pada panjang gelombang 450 nm.

Analisis statistik

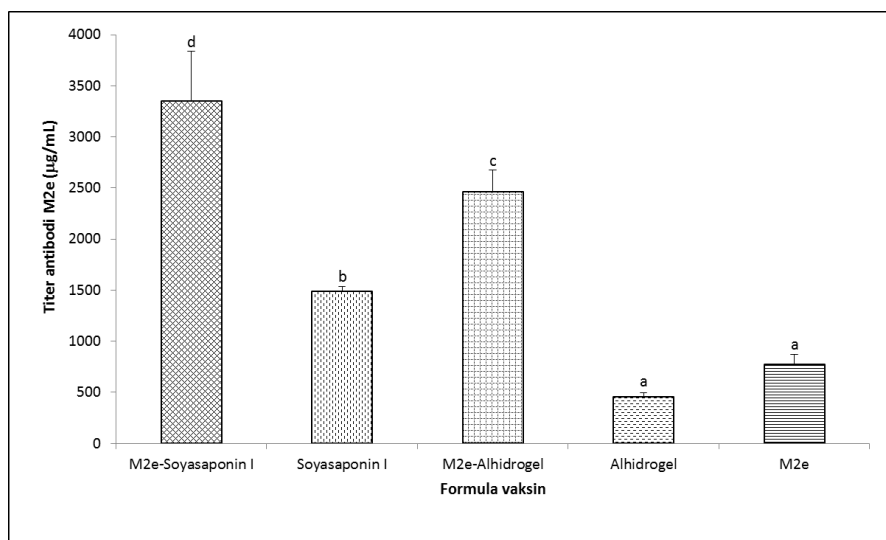
Analisis statistik data dilakukan dengan *one way-ANOVA*, sebagai rata-rata dan standar deviasi dari rata-rata. Perbedaan antar nilai rata-rata didapatkan berdasarkan signifikansi ketika nilai $p < 0,05$.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Antibodi yang terkandung dalam serum darah mencit diencerkan 640 kali (sesuai hasil optimasi) kemudian diuji menggunakan ELISA. Hasil pengukuran ELISA yang berupa absorbansi dikonversi menjadi titer antibodi dengan dibandingkan terhadap standar IgG M2.

Formula vaksin yang mengandung adjuvan soyasaponin I dan alhidrogel diinokulasikan pada mencit secara terpisah. Selain itu, untuk melihat pengaruh komponen utama vaksin, alhidrogel, soyasaponin I dan epitop M2e pun diinokulasikan masing-masing pada mencit galur yang sama. Gambar 1 menunjukkan bahwa alhidrogel dan epitop M2e masing-masing memberikan respon antibodi yang hampir sama, ditunjukkan dengan nilai yang secara statistik tidak signifikan. Berbeda dengan soyasaponin I, adjuvan ini menghasilkan respon antibodi yang jauh lebih besar dibanding dengan alhidrogel. Kemudian dalam peranannya sebagai adjuvan, soyasaponin I lebih kuat dalam menghasilkan respon antibodi dibanding alhidrogel dengan nilai yang cukup signifikan secara statistik pada formula vaksin M2e-soyasaponin I dengan M2e-alhidrogel.

Hal ini dapat dijelaskan sesuai Song & Hu (2009) bahwa proses terbentuknya respon kekebalan tubuh selalu melibatkan aktivasi sel T. Mekanisme soyasaponin dalam membangkitkan atau mengaktifkan sel T belum ditemukan dengan pasti, namun secara umum kelompok saponin mengandung aldehid yang berperan dalam aktivasi sel T. Terdapat dua mekanisme yang harus selalu ada untuk aktivasi sel T oleh gugus aldehid pada saponin. Mekanisme pertama, gugus aldehid pada saponin memediasi pengiriman antigen yang berasal dari luar secara langsung menuju sel-sel penyaji antigen yang berada di sitosol melalui MHC kelas I. MHC kelas I ini menyajikan antigen tersebut kepada reseptor sel T, sehingga sel T menjadi aktif. Mekanisme kedua,



Gambar 1. Titer antibodi M2e terhadap formulasi vaksin: M2e-soyasaponin I (▨), M2e-alhidrogel (▩), kontrol adjuvan: soyasaponin I (▧), alhidrogel (▦), dan epitop peptida M2e (▤). Nilai yang ditampilkan merupakan rata-rata dari tiga percobaan dan error bar menunjukkan standar deviasi.

gugus aldehid pada saponin bereaksi dengan gugus amino pada reseptor di permukaan sel T, lalu membentuk suatu imina yang dikenal sebagai B7. B7 ini berikatan dengan protein kostimulator, CD28 pada sel T, sehingga sel T menjadi aktif. Sel T yang aktif akan berubah menjadi sel T penolong I atau sel T penolong 2 atau menjadi keduanya (Song & Hu, 2009).

Berdasarkan adanya titer antibodi M2e pada serum, maka soyasaponin I dapat mengaktifkan sel T menjadi sel T penolong 2. Karena sel T penolong 2 ini yang akan mengaktifkan sel B sehingga dihasilkan antibodi.

KESIMPULAN

Soyasaponin I dapat meningkatkan imunogenisitas epitop peptida M2e lebih tinggi dibanding dengan alhidrogel. Sehingga soyasaponin I berpotensi sebagai adjuvan.

Ucapan Terima Kasih

Ucapan terimakasih kepada Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi, Kementerian Pendidikan Nasional, Republik Indonesia atas bantuan dana penelitian melalui program Insentif SiNAS Ristek 2011-2014, PT. Bio Farma (Persero) atas bantuan mencit BALB/c dan bahan pendukung lainnya.

DAFTAR PUSTAKA

Carrat, F. & Flahault, A. (2007). Influenza vaccine: the challenge of antigenic drift, *Vaccine*, 25, 6852-6862.

Denis, J., Ramirez, E. A., Zhao, Y., Hamelina, M. E., Koukavica, I. Baz, M., Abed, Y., Savard, C., Pare, C., Macia, C. L., Boivin, G., & Leclerc, D. (2008). Development of a universal influenza A

vaccine based on the M2e peptide fused to the papaya mosaic virus (PapMV) vaccine platform, *Vaccine*, 26, 3395-3403.

Fiers, W., Filette, M. De, Birkett, A., Neiryck, S., & Min Jou, W. (2004). A "universal" human influenza A vaccine, *Virus Research*, 103, 173-176.

Hoff, J. (2000). Methods in blood collection in mouse, *Technique*, 29, 47-53.

Nikbakht, G., Jahntigh, M., & Assadian, F. (2012). Generation of egg yolk antibodies in chicken (IgY) against influenza M2 (M2e) protein. international conference on chemical, *Biological and Medical Sciences (ICBMS'2012)*, Malaysia.

Oda, K., Matsuda, H., Murakami, T., Katayama, S., Ohgitali, T. & Yoshikawa, M. (2003). Relationship between adjuvant activity and amphipathic structure of soyasaponins, *Vaccine*, 21, 2145-2151.

Parasuraman, S., Raveendran, R., & Kesavan, R. (2010). Blood collection in small laboratory animals, *Journal of pharmacology and pharmacotherapeutics*, 1, 87-93.

Reed, S. G., Bertholet, S., Coler, R. N. & Friede, M. (2008). New horizons in adjuvants for vaccine development, *Trends in Immunology*, 30, 23-32.

Song, X. & Hu, S. (2009). Adjuvant activities of saponins from traditional Chinese medicinal herbs, *Vaccine*, 27, 4883-4890.

Sun, H. X., Xie, Y., & Ye, Y. P. (2009). Advances in saponin-based adjuvants, *Vaccine*, 27, 1787-1796.

WHO. (2012). Cumulative number of confirmed human cases of avian influenza A/(H5N1) reported to WHO.