

RESEARCH ARTICLE

IMMUNOGENITAS ANTIBODI BETA AMYLOID POLIKLONAL SEBAGAI STUDI AWAL PENGEMBANGAN DIAGNOSIS DINI PENYAKIT ALZHEIMER

BETA AMYLOID POLYCLONAL ANTIBODY IMMUNOGENICITY AS EARLY DEVELOPMENT STUDY OF EARLY DIAGNOSIS FOR ALZHEIMER'S DISEASE

Muhamad Rasjad Indra*, Eko Arisetijono Marhaendraputro**, Rudi Rakhmad Hidayat***

*Laboratorium Fisiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, Malang, Indonesia

**Laboratorium Neurologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, Malang, Indonesia

***Program Studi Pendidikan Dokter Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, Malang, Indonesia

pISSN : 2407-6724 • eISSN : 2442-5001 • <http://dx.doi.org/10.21776/ub.mnj.2017.003.01.1> • MNJ.2017;3(1):1-4

• Received 23 February 2017 • Reviewed 1 March 2017 • Accepted 9 March 2017

ABSTRAK

Latar belakang. *Alzheimer disease* adalah penyakit progresif neurologis otak yang memicu kehilangan sel neuron secara *irreversible*, yang dapat mengganggu fungsi sosial dan pekerjaan. Teori ACH (*Amyloid Cascade Hypothesis*) menyebutkan deposit dan *misfolding* protein beta amyloid menyebabkan terbentuknya plak dan degenerasi sel neuron.

Tujuan. Mengidentifikasi immunogenitas antibodi beta amyloid poliklonal sehingga dapat dikembangkan sebagai langkah awal diagnosis dini penyakit alzheimer.

Metode. *Randomized Group Post Test Only Design* dilakukan pada kelinci. Sampel diambil dari darah kelinci yang telah diinjeksikan antigen seminggu sekali selama 5 minggu. Variabel yang dilihat pada penelitian ini adalah terbentuknya antibodi beta amyloid poliklonal dengan pengecekan kadar menggunakan metode Dot Blot dan ELISA.

Hasil. Telah terproduksi antibodi poliklonal beta amyloid secara spesifik yang telah dibuktikan dengan adanya ikatan antara antigen dengan antibodi pada dot blot.

Simpulan. Antibodi beta amyloid dapat diproduksi melalui teknik produksi antibodi poliklonal dengan induksi antigen beta amyloid pada kelinci.

Kata kunci: Antibodi, beta amyloid, penyakit Alzheimer

ABSTRACT

Background. *Alzheimer's disease* is a progressive neurologic disease of the brain that triggers irreversible neuronal cell loss, which can interfere with social and occupational functioning. The theory of ACH (*Amyloid Cascade Hypothesis*) states there are deposits and misfolding of beta amyloid protein thus lead to the formation of plaques and tangles in neurons cells.

Objective. To identify the immunogenicity of beta amyloid polyclonal antibodies that can be developed as a first step early diagnosis of Alzheimer's disease.

Methods. *Randomized group post test only design* conducted on rabbits. Blood samples were taken from rabbits that had been injected antigen once a week for 5 weeks. Variables were found in this study is the formation of beta amyloid polyclonal antibody with detection levels using dot blot and ELISA methods.

Results. It has been reproduced specific polyclonal antibody beta amyloid which has been evidenced by the bond between the antigen with the antibody in a dot blot.

Conclusion. The beta amyloid antibodies can be produced through production techniques with a polyclonal antibody against beta amyloid antigen induced rabbit.

Keywords: Alzheimer's disease, antibodies, beta amyloid

PENDAHULUAN

Alzheimer disease adalah penyakit progressif neurologis otak yang memicu kehilangan sel neuron secara *irreversible*, kemampuan intelektual, termasuk ingatan dan kemampuan berfikir, yang dapat mengganggu fungsi sosial dan pekerjaan. Selama perjalanan penyakit, terbentuk plak protein beta amyloid yang menyebabkan apoptosis dari sel-sel otak.¹ Beta amyloid adalah suatu gugus peptida, yang terdiri dari 36-43 asam amino yang diproses dari *amyloid precursor protein*, yang diketahui sebagai komponen utama deposit protein pembentuk plak amyloid pada *alzheimer disease*.²

Pada saat ini WHO memperkirakan populasi penderita demensia diseluruh dunia sekitar 25 juta orang, sebagian besar demensia ini diakibatkan oleh alzheimer. Penyakit alzheimer ditemukan lebih sering pada orang yang berusia lebih dari 50 tahun. Pada usia 65 tahun, setiap orang mempunyai resiko terkena alzheimer sebesar 5%, seiring dengan bertambahnya usia maka kemungkinan terkena alzheimer juga bertambah. Diperkirakan pada tahun 2050 terdapat peningkatan jumlah pasien alzheimer sebanyak 4 kali. Angka ini diakibatkan karena meningkatnya penduduk lanjut usia di dunia.³

Salah satu teori yang paling berpengaruh dalam menjelaskan patogenesis *alzheimer disease* adalah *amyloid cascade hypothesis* (ACH), teori ini pertama kali dirumuskan pada tahun 1992. ACH menjelaskan bahwa pengendapan beta amyloid adalah peristiwa patologis awal dalam *alzheimer disease* yang mengarah pada pembentukan *Senile Plaques* (Sps) dan secara progresif akan membentuk *Neurofibrillary Tangles* (NFTs) dari sel neuron yang mati, dan akhirnya menjadi demensia.⁴ Penatalaksanaan *alzheimer disease* saat ini meliputi terapi farmakologi dan non-farmakologi. Terapi non-farmakologi pada *alzheimer disease* seperti modifikasi gaya hidup, modifikasi lingkungan, aktivitas yang sesuai, dan penyederhanaan aktivitas. Terapi farmakologisnya dibagi menjadi terapi fungsi kognisi dengan cara memberikan (*cholinesterase inhibitors*, *N-Metyl-D-Aspartate Antagonist*), terapi untuk gejala perilaku dan gangguan mood diberikan (obat antipsikotik, mood stabilitor (agen anti agitasi), obat anti-depresi). Akan tetapi semua terapi diatas masih belum bisa menyembuhkan *alzheimer disease*. Namun, berbagai terapi yang ada pada saat ini

masih sebatas langkah untuk memperlambat progresifitas dan menghilangkan gejala *alzheimer disease* saja, karena itulah diperlukan suatu terapi spesifik yang beraksi pada tempat yang sakit.

Alzheimer disease merupakan penyebab umum dari demensia, sampai saat ini belum ada obat yang bisa menyembuhkan penyakit ini, bahkan progresifitas dari penyakit ini akan terus bertambah kronis seiring dengan berjalannya waktu. Progresifitas dari alzheimer itu sendiri sampai sekarang belum sepenuhnya jelas. Namun, beberapa peneliti menemukan adanya *plaque* dan *tangle* pada otak penderita alzheimer. Penelitian sebelumnya melaporkan terbentuknya *plaque* dan *tangle* ini diakibatkan oleh protein *beta amyloid*, yang mengindikasikan memburuknya progresifitas, bahkan memicu kematian. Antibodi adalah molekul yang hanya akan mengenali antigennya, antibodi beta amyloid akan mengenali protein beta amyloid. Sehingga beta amyloid sangat potensial untuk dijadikan target terapi maupun sebagai kit pendeteksi berbasis antibodi poliklonal beta amyloid.⁵

METODE PENELITIAN

Penelitian ini menggunakan desain eksperimen murni (*true experimental design*) di laboratorium secara *in vivo* menggunakan rancangan *Randomized Group Post Test Only Design*. Studi ini dilakukan untuk mengetahui apakah beta amyloid dapat menginduksi pembentukan antibody beta amyloid. Antibodi yang dihasilkan, dideteksi dengan metode Dot Blot. Selanjutnya untuk mengetahui kadar titer antibodi beta amyloid secara kuantitatif, digunakan uji ELISA.

Sampel penelitian. Sampel penelitian adalah 2 ekor kelinci jantan albino. Kelinci digunakan untuk memproduksi antibodi beta amyloid karena kelinci paling umum digunakan dalam produksi antibodi poliklonal, di samping lebih murah, serta mudah perawatannya. Secara umum, apabila hubungan filogenetik semakin jauh, maka potensi titer antibodi bisa tinggi.

Variabel penelitian. Variabel bebas dalam penelitian ini adalah antibodi beta amyloid yang dihasilkan oleh kelinci dengan antigen beta amyloid. Dan variabel tergantung dalam penelitian ini adalah banyaknya ikatan antigen-antibodi beta amyloid pada dot blot dan ELISA.

Lokasi penelitian. Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Biomedik FKUB, Laboratorium

Fisiologi FKUB, serta Laboratorium Biokimia FMIPA Universitas Brawijaya, pada tahun 2013.

Definisi operasional. Hewan coba: hewan coba yang digunakan sebagai produsen antibodi dalam penelitian ini adalah kelinci albino jantan berusia 12-16 minggu yang dibeli dari Fakultas Peternakan Universitas Brawijaya.

Beta-amyloid human peptide: antigen berupa protein beta amyloid dari manusia yang dimurnikan dan digunakan untuk menginduksi terbentuknya antibodi beta amyloid pada kelinci yang dibeli dari US BIO

Complete Freund's Adjuvant (CFA) dan Incomplete Freund's Adjuvant (IFA): CFA digunakan sebagai adjuvan pada penginjeksian antigen pertama sedangkan IFA digunakan sebagai adjuvan pada penginjeksian (*booster*) selanjutnya. CFA dan IFA didapatkan dari Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya

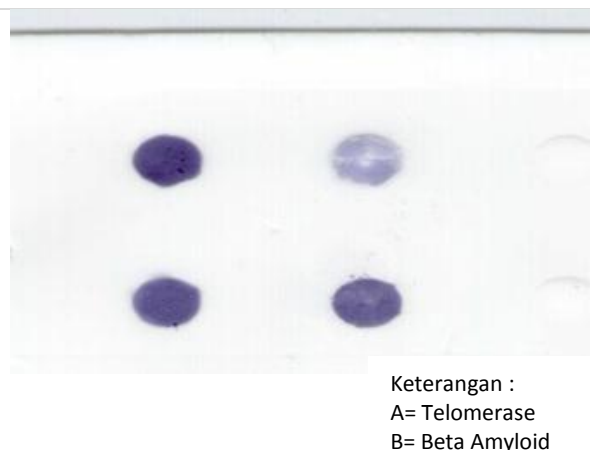
Antibodi beta-amyloid : antibodi yang dihasilkan oleh kelinci karena induksi antigen yang diinjeksi ke dalam tubuh kelinci. Pengecekan kadar antibodi yang terbentuk dengan metode ELISA dan Dot Blot.

HASIL PENELITIAN

Dot Blot

Untuk dot blot digunakan sampel pada minggu ke-1 dan minggu ke-3 paska *booster*. Diharapkan, titer antibodi pada minggu pertama memiliki gradasi warna yang lebih pucat daripada titer antibodi pada minggu ketiga, karena memiliki jumlah titer yang lebih rendah.

Hasilnya, terdapat perbedaan gradasi warna antara *well* ke-1 dan ke-2. *Well* pertama berisi antibodi pada minggu pertama, sedangkan *well* kedua berisi antibodi pada minggu ketiga. Pengamatan secara kualitatif mengindikasikan terdapat ikatan yang lebih banyak antara *well* ke-2 daripada *well* ke-1.



Gambar 1. Hasil Dot Blot Antibodi Beta Amyloid pada Darah Panen pada Minggu pertama dan ketiga.

ELISA

Setelah diketahui terdapat peningkatan kadar titer antibody, selanjutnya untuk mengetahui kadar titer antibodi beta amyloid secara kuantitatif, digunakan uji ELISA. Hasil uji immunoblotting antara antibodi beta amyloid yang dihasilkan penelitian ini dengan protein beta amyloid disajikan pada tabel 5.1, yang menunjukkan bahwa sampai pada minggu ke-5 antibodi beta amyloid masih diproduksi. Produksi antibodi beta amyloid ini dilakukan dengan *booster* 1 kali. Sedangkan, grafik pergerakan titer antibodi, dapat dilihat pada gambar 5.2. Pada minggu 1-3 terjadi kenaikan produksi antibodi beta amyloid dan menurun pada minggu ke-4. Pada minggu ke-5 produksi meningkat lebih tinggi, hal ini terjadi karena adanya sel memori yang pernah terpapar sebelumnya. Hasil ini juga menunjukkan bahwa antibodi beta amyloid mampu mengenali adanya peningkatan beta amyloid.

Tabel 1. Hasil Pengukuran Titer Antibodi Beta Amyloid Poliklonal pada ELISA Menggunakan ELISA Reader405nm.

Minggu Ke-	Absorbansi pada pengenceran 1/20 dalam OD	Absorbansi pada kontrol dalam OD
1	2.820	1.8
2	2.984	1.8
3	3.318	1.8
4	3.279	1.8
5	3.280	1.8

DISKUSI

Pada penelitian ini telah dilakukan uji Dot Blot dan ELISA untuk mengetahui kadar titer antibodi beta amyloid pada serum darah, secara kualitatif dan kuantitatif pada hewan coba yang diinduksi dengan beta amyloid. Dengan uji metode Dot Blot, secara kualitatif menunjukkan terdapat perubahan gradasi warna menjadi lebih gelap pada minggu ketiga penghasilan antobodi, dibandingkan pada minggu pertama. Hal ini mengisyaratkan bahwa terdapat peningkatan kadar titer antibodi dari serum kelinci minggu pertama dibandingkan dengan serum kelinci minggu ketiga.

Anoop., *et al* pada tahun 2010, menjelaskan mengenai beragam biomarker pada cairan serebrospinal yang dapat digunakan sebagai pendeteksi dini penyakit Alzheimer, dengan Uji ELISA. Salah satu biomarker yang digunakan adalah antibody beta amyloid. Penurunan rasio antibody betamyloid 42/antibody beta amyloid 40, telah terbukti bermanfaat dalam mendeteksi dini penyakit Alzheimer.⁶

Namun, kelemahan dari sediaan sampel cairan serebrospinal adalah metode invasifnya, yang harus dilakukan punksi lumbal untuk mengambil sampel, dan tingginya kegagalan diagnosis, akibat penyimpanan dan transportasi sampel. Sehingga, perlu dikembangkan metode deteksi dini dengan sampel serum darah.⁶

Molekul antibodi hanya akan mengenali setiap molekul antigen yang sesuai dan spesifik pada antigennya. Antibodi beta amyloid hanya akan mengenali antigennya yaitu beta amyloid.⁵ Harapannya, apabila antibodi beta amyloid mampu untuk mengikat antigennya yaitu beta amyloid, maka dapat dijadikan suatu alat diagnostikpotensial untuk deteksi dini penyakit *Alzheimer*.

Penelitian ini merupakan penelitian pendahuluan yang menunjukkan bahwa induksi protein beta amyloid, dapat meningkatkan kadar titer antibody beta amyloid secara kualitatif, dengan Dot Blot, dan secara kuantitatif, dengan ELISA. Sebagai suatu penelitian yang bertujuan untuk dikembangkan sebagai suatu metode awal dalam

pendeteksian dini, penggunaan antibodi poliklonal dapat ditingkatkan kualifikasinya menggunakan antibodi monoklonal. Antibodi monoklonal diharapkan dapat menambah nilai penelitian dengan meningkatkan spesifiitasnya dalam mengenali hanya satu *epitope* antigen saja. Sebagai suatu metode yang diharapkan dapat digunakan sebagai metode yang aplikatif dalam bidang kedokteran, diperlukan berbagai uji laboratorium tambahan seperti pengujian pada sel otak manusia, pada hewan makakumulata, dan dilanjutkan dengan percobaan *clinical trial* pada sampel manusia..

SIMPULAN

Antibodi beta amyloid dapat diproduksi melalui teknik produksi antibodi poliklonal dengan induksi antigen beta amyloid pada kelinci.

DAFTAR PUSTAKA

1. Berchtold NC, Cotman CW. Evolution in the conceptualization of dementia and Alzheimer's disease: Greco-Roman period to the 1960s. *Neurobiol. Aging*. 2008;19(3):173–89.
2. Lahiri DK, Maloney B. "Beyond the signaling effect role of amyloid- β 42 on the processing of A β PP, and its clinical implications". *Exp. Neurol*. 2010;225 (1): 51–4.
3. Brookmeyer R, Johnson E, Ziegler-Graham K, MH Arrighi. Forecasting the global burden of Alzheimer's disease. *Alzheimer's and Dementia*. 2007 [cited 2008-06-18];3(3):186–91.
4. G. Glenner and C. W. Wong, "Alzheimer's disease and Down's syndrome: sharing of a unique cerebrovascular amyloid fibril protein," *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2004, vol. 122, no. 3, pp. 1131–1135.
5. Abbas AK, Licthman AH. *Basic Immunology* edisi 3. Saunders. 2010.
6. Anoop, A., Pradeep K. Singh., Reeba S. Jacob., and Samir K. Maji. CSF Biomarkers for Alzheimer's Disease Diagnosis. *Int J Alzheimer Dis*. 2010; 2010: 606802. Published online Jun 23, 2010. doi: 10.4061/2010/606802. PMCID: PMC291579.