

VAKSIN DENGUE DAN PERKEMBANGANNYA SAAT INI DAN DI MASA MENDATANG

Triwibowo Ambar Garjito*

Abstrak

Dengue virus merupakan salah satu virus anggota dari famili Flaviviridae yang sejak tahun 1956 telah dikenal dapat menimbulkan demam dengue maupun demam berdarah dengue (DBD). Penyakit yang ditularkan oleh nyamuk Aedes aegypti ini diperkirakan telah menjangkiti pada sekitar 50-100 juta manusia dengan 500.000 kasus di antaranya dalam manifestasi yang ganas yang dikenal sebagai dengue haemorrhagic fever dan dengue shock syndrome dan 25.000 di antaranya berakibat fatal (meninggal).

Saat ini pengembangan vaksin merupakan salah satu solusi yang diharapkan dapat menekan penyebaran penyakit tersebut. E (envelope) merupakan salah satu bagian dari protein struktural virus yang sangat penting dalam pengembangan vaksin, yaitu sebagai badan yang memproduksi antibodi netralisasi untuk protein. Non-struktural protein 1 juga telah diketahui sebagai salah satu komponen penting dalam pengembangan vaksin oleh karena kemampuannya untuk dapat diekspresi pada permukaan sel yang diinfeksi yang dapat menjadi target untuk immune cytolisis. Ada dua pendekatan yang digunakan dalam memproduksi suatu vaksin dengue, yaitu: a. Vaksin hidup yang telah dilemahkan (live attenuated vaccine); b. Vaksin hasil rekayasa (engineered vaccine).

Penelitian terhadap vaksin DENV baik rekombinan maupun non-rekombinan yang didasarkan pada uji virus telah dilakukan secara terus-menerus baik pada monyet dan manusia. Sampai saat ini telah dikembangkan sejumlah kandidat vaksin DENV yang berdasar pada tetravalent virus dengue, yaitu a. vaksin konvensional, b. vaksin dengue rekombinan berdasar pada flavivirus, c. vaksin intertypic chimeric, d. vaksin chimerivax, e. vaksin dengue rekombinan menggunakan vector non-flavivirus dan f. vector adenovirus. Namun demikian, sampai sekarang belum ada vaksin yang siap digunakan untuk menangkal infeksi ke empat serotype virus dengue, sehingga masih diharapkan untuk pengembangan virus lebih lanjut.

Kata kunci: Aedes aegypti, dengue virus, vaksin dengue.

Pendahuluan

Dengue virus merupakan salah satu virus anggota dari famili *Flaviviridae* yang sejak tahun 1956 telah dikenal dapat menimbulkan demam dengue maupun demam berdarah dengue (DBD). Saat ini, telah diketahui terdapat 4 serotipe dari virus dengue (DEN-1, DEN-2, DEN-3 dan DEN-4) yang bersirkulasi di kawasan tropis dan sub-tropis di seluruh dunia. Virus yang membawa suatu genom RNA rantai tunggal dengan *single open reading frame* RNA ini diperkirakan telah menjangkiti pada sekitar 50-100 juta manusia dengan 500.000 kasus di

antaranya dalam manifestasi yang ganas yang dikenal sebagai *dengue haemorrhagic fever* dan *dengue shock syndrome* dan 25.000 di antaranya berakibat fatal (meninggal). Tidak kurang dari 100 negara telah menjadi endemis akibat dari penyakit yang disebabkan oleh virus dengue ini, bahkan virus ini telah menjadi salah satu penyebab kesakitan dan kematian utama anak-anak pada tidak kurang dari 8 negara di asia.^{1,2,3,4,5,6}

Sampai saat ini, belum ada terapi spesifik dalam pengobatan DBD. Pengendalian vektor yang cukup banyak menyerap biaya juga dirasa-

* Loka Litbang P2B2 Donggala, Badan Litbang Kesehatan, Depkes R.I.

kan belum efektif karena banyak faktor yang berpengaruh. Tampaknya diperlukan upaya pencegahan lain yang diharapkan dapat mendukung keberhasilan dalam penanganan penyakit ini. Salah satu upaya yang saat ini diharapkan adalah pengembangan vaksin yang efektif.

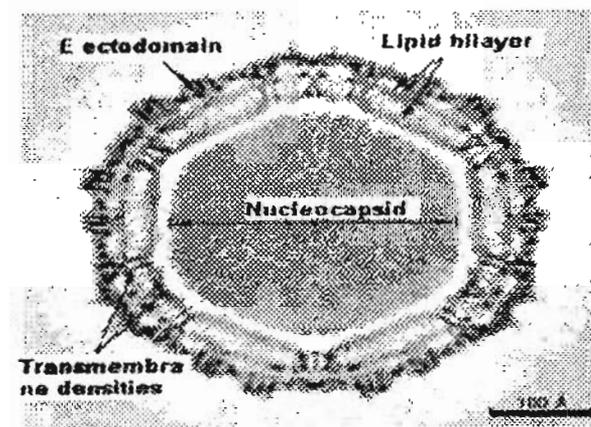
Makalah ini menyajikan kajian perkembangan vaksin dengue berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan sebelumnya yang diharapkan dapat mendukung dalam pengembangan vaksin dengue di Indonesia.

Struktur Virus Dengue dan Siklus Replikasinya

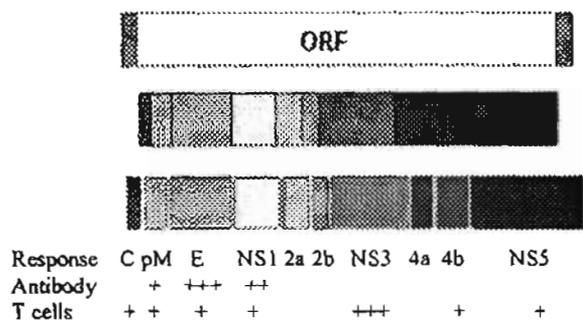
Struktur virus dengue merupakan suatu faktor yang penting dalam strategi pengembangan

vaksin dengue. Dengue virus tersusun dari viral genom, 3 struktural protein (C, M, E) dan tidak kurang 7 non-struktural protein. Adapun organisasi genom dari virus dengue adalah 5'-UTR-C-prM -E-NS1-NS2A-NS2B-NS3-NS4A-NS4B-NS5-UTR-3' (UTR: untranslated region, C: capsid, prM: precursor membrane, E: envelope, NS: non struktural).^{2,3}

Genom virus dengue merupakan RNA yang berpolaritas positif, yaitu apabila viral RNA yang telanjang masuk ke dalam suatu sel, maka viral protein dan seringkali viral partikel akan segera diproduksi. Hal ini berbeda dengan virus RNA yang berpolaritas negatif, seperti misalnya virus rabies, yang membutuhkan suatu polymerase untuk membentuk protein virus.^{1,2}



Gambar 1. Struktur Virus Dengue yang Dilihat Menggunakan cryoelectron microscopy (cryo-EM)²⁰



Gambar 2. Organisasi dari genom flavivirus yang menghasilkan protein dan gambaran lokasi dari target utama dari respon imun. Genom DENV merupakan rantai tunggal RNA dengan suatu *single open reading frame* (ORF). ORF ini ditranslasikan sebagai suatu poliprotein tunggal yang dipecah oleh protease hospes dan virus menjadi 10 protein viral²

Dalam siklus replikasinya, virus dengue menempel pada sel hospesnya melalui dua cara, yaitu terikat pada reseptor virus yang ada di permukaan sel dan melalui antibodi anti dengue yang terikat pada sel. Setelah menempel, virus masuk ke dalam sel dengan dua cara, yaitu endositosis/pinositosis dan fusi antara selubung virus dengan membran plasma yang diikuti dengan pelepasan nukleokapsid ke dalam sitoplasma sel. Fusi ini berlangsung lebih baik pada suasana asam.^{4,5}

Monosit Makrofag (mΦ) merupakan target utama bagi virus dengue. Protein E virus berperan sebagai penghubung utama untuk melekat pada sel, akan tetapi reseptor yang terdapat pada sel hospes justru bersifat menghindar. Molekul reseptor sel hospes tersebut termasuk diantaranya protein, reseptor Fc, glycosaminoglicans (GAGS) dan lipopilosakarida yang berikatan dengan molekul yang berasosiasi dengan CD-14.⁷

Fase awal pada saat virus dengue masuk ke dalam sel dibagi menjadi menjadi dua, yaitu adsorpsi dan penetrasi. Selanjutnya setelah terjadi pelepasan kapsid adalah translasi RNA virion menjadi RNA polimerase yang kemudian digunakan untuk membuat RNA cerminan genom. Dalam proses replikasi RNA, di dalam sel akan dapat ditemukan tiga jenis RNA, yaitu a). RNA yang tahan ensim RNase, merupakan RNA serat ganda di mana serat satunya merupakan genom virus. RNA ini disebut bentuk replikatif; b). RNA yang relatif tahan RNase, merupakan RNA serat ganda parsial dan disebut bentuk replikatif antara; c). RNA yang merupakan genom virion. Pada saat replikasi, RNA polimerase pada siklus fase awal dan lanjut berbeda afinitasnya terhadap serat RNA berpolaritas positif dan negatif, sedemikian rupa sehingga pada fase lanjut siklus replikasi terutama membentuk serat RNA yang berpolaritas positif. Selanjutnya pada akhir siklus pengikatan protein C pada ujung 3' RNA menghalangi ikatan RNA polimerase dengan molekul RNA dan tetap membiarkan ujung 5' berikatan dengan ribosom, sementara sintesis protein tetap berlangsung sebagai persiapan morfogenesis lengkap virion.²⁰

Translasi genom virus dimulai dari kodon AUG gen protein C dan terus berlanjut menuju ke gen protein NS5 sehingga produknya merupakan poliprotein. Poliprotein tersebut kemudian akan dipecah oleh berbagai enzim baik yang berasal dari sel hospes maupun virus (bila sintesisnya diatur oleh gen virus) menjadi protein C, prM, E, dan NS (1-5). Pada fase akhir siklus replikasi,

yaitu menjelang/bersamaan dengan morfogenesis virion, prM akan dipecah menjadi M. Setelah semua komponen virion disintesis, kemudian akan terjadi morfogenesis lengkap virion.²⁰

Respon Imun Hospes terhadap Virus Dengue

Sampai saat ini pengetahuan mengenai pathogenesis infeksi virus dengue masih sangat sedikit dan terbatas. Virus dengue dapat menyebabkan sakit melalui dua mekanisme, yaitu dengan cara menginfeksi dan membunuh sel tersebut, atau melalui stimulasi respon imun hospes yang akan menyebabkan sel menjadi terinduksi. Proses timbulnya penyakit yang disebabkan oleh adanya respon imun hospes ini dikenal sebagai Immunopathogenesis. Menurut Gubler (1998), pathogenesis dari infeksi virus yang ganas ditimbulkan oleh adanya dua faktor, yaitu faktor imun virus dan imun hospes.⁸

Dua perubahan patofisiologis utama yang dialami pada pasien DBD adalah: a) meningkatnya permeabilitas vaskuler, yang akan menyebabkan terjadinya hemokonsentrasi, tekanan darah rendah dan syok; b). kehilangan plasma sebagai akibat hemostasis, trombocytopenia dan koagulopathy.¹⁸

Hipotesis dan mekanisme yang memicu terjadinya DBD dapat dijelaskan melalui teori Russell dan Halstead. Menurut Russell, pathogenesis DBD terjadi oleh karena aktivasi komplemen oleh kompleks antigen-antibodi virus dengue, sedangkan menurut Halstead, pathogenesis DBD disebabkan oleh karena adanya peningkatan antibodi dan meningkatnya sel monosit yang terinfeksi.⁹

Beberapa studi pathogenesis telah menunjukkan bahwa sebagian besar dari pasien DBD disebabkan oleh karena infeksi sekunder. Studi yang telah dilakukan pada simpanse menunjukkan bahwa titer virus dengue pada serum lebih tinggi selama infeksi sekunder daripada saat infeksi primer. Pada manusia, keganasan yang muncul akibat infeksi virus dengue berhubungan dengan tingginya titer viremia dan oleh adanya infeksi sekunder virus dengue. Meskipun demikian, kasus DBD selama infeksi primer juga telah dilaporkan.^{10,11}

Selama terjadi infeksi sekunder oleh serotipe virus dengue yang heterolog, antibodi dapat mengenali virus dan mengikatnya membentuk kompleks virus-antibodi. Kompleks ini akan lebih mudah masuk ke dalam sel hospes

dari virus yang tidak berkapsul (*uncoated virus*) melalui sel *mononuclear* yang mempunyai reseptor Fc γ , khususnya Makrofaq. Selain itu, *cross-reactive antibody* gagal untuk menetralisasi virus, sehingga virus akan mereplikasi pada sisi sel bebas lainnya. Fenomena ini dikenal sebagai infeksi *Antibody dependent enhancement* (ADE).^{10,12,14}

Pengikatan kompleks antigen-antibodi dengue terhadap monosit akan mengaktivasi memori T limfosit spesifik virus untuk memproduksi mediator vasoaktif yang disebut sitokin. Pelepasan sitokin secara cepat dan lysis pada monosit yang terinfeksi virus dengue oleh CD4 dan CD8 T limfosit sitotoksik spesifik virus dengue akan menyebabkan terjadinya kebocoran plasma dan pendarahan. CD4 T limfosit akan menghasilkan interferon (IFN) γ , interleukin (IL)-2, tumor necrosis factor (TNF) α , dan lymphotoxin (TNF β), sedangkan CD8 T limfosit menghasilkan IFN γ . TNF α juga diproduksi oleh monosit yang terinfeksi.¹⁸

Sitokin mempunyai pengaruh baik langsung, maupun tidak langsung pada sel endothelium untuk menginduksi bocornya kapiler. IL-2 akan memfasilitasi proliferasi T limfosit. IFN γ tidak menginduksi kebocoran plasma secara langsung tetapi akan meningkatkan produksi TNF α dan kemudian akan berinteraksi dengan TNF α untuk mengaktivasi sel endothelium. Selain itu, IFN γ juga akan meningkatkan keberadaan antigen dengue di dalam monosit untuk meningkatkan uptake virus dengue ke dalam monosit. CD4 dan CD8 sitotoksik T limfosit juga dapat mempunyai kemampuan melisis sel target yang terinfeksi.¹⁸

Kompleks antibody-virus dengue dan beberapa sitokin juga mengaktivasi lepasnya hasil aktivasi komplemen seperti C3a dan C5a yang mempunyai efek langsung pada permeabilitas vascular. C3a dan C5a juga menstimulasi sel jaringan tiang untuk melepaskan histamin yang akan dapat meningkatkan permeabilitas pembuluh darah dan menyebabkan *gap formation* antara sel endothelium. Kondisi ini akan mendorong pergerakan neutrophil untuk menyeberang endothelium.^{9,10,12,14}

Beberapa studi klinis telah menunjukkan bahwa produksi T limfosit dan sitokin sesungguhnya berperan kunci di dalam DBD. Hal ini ditunjukkan oleh tingkat TNF α pada sample plasma yang diambil pada anak-anak yang menderita DBD mempunyai tingkat TNF α secara

signifikan lebih tinggi daripada pada anak-anak yang menderita demam dengue. Apabila dibandingkan, CD4 terlarut (sCD4), CD8 terlarut (sCD8), reseptor IL-2 (sIL-2R) dan reseptor TNF (sTNFR-I dan sTNFR-II) merupakan indikator tetap pada aktivasi imun daripada sitokin. Selain itu juga menunjukkan bahwa level plasma sCD8, sIL-2 dan sTNFR-II lebih tinggi pada anak-anak dengan DBD daripada anak-anak dengan demam dengue (*Dengue Fever*).^{18,19}

Lebih dari itu, pengaruh sitokin untuk menginduksi permeabilitas vaskuler akan dapat meningkatkan efek sinergik. Sebagai contoh, TNF α dan IL-1 akan menyebabkan produksi TNF α , IL-1, IL-6, IL-8, dan PAF (suatu fosfolipid *autocoid*) yang dapat meningkatkan permeabilitas vaskuler dari masing-masing sitokin tersebut.¹⁸

Apabila sejumlah kecil sitokin diproduksi, suatu jaringan kompleks sitokin akan diproduksi. Dari sini, sitokin akan meningkat secara cepat dan akan memicu terjadinya peningkatan permeabilitas vaskuler dalam waktu pendek. Model hipotesis ini dapat digunakan untuk menjelaskan hubungan umur bayi yang telah memiliki titer antibody terhadap DBD di dalam serumnya. Kondisi ini juga menunjukkan gambaran bahwa terbentuknya antibody terhadap DBD pada bayi diperoleh melalui infeksi primer yang diperoleh *transplacenta* melalui ibunya. Apabila ibu memiliki titer antibody yang tinggi, bayi yang baru lahir akan segera membentuk antibody terhadap demam berdarah dengue.⁹

Menurut Chaturvedi *et. al.*,¹⁵ imunosupresor spesifik antigen diperantarai oleh Suppressor T limfosit. *Murine cytotoxic factor* (MCF) dan sitotoksin (CF2) secara selektif akan membunuh Makrofaq (M Φ) dan sel T helper (TH) untuk menghambat respon imun terhadap antigen dengue yang heterolog.

Apoptosis di dalam sel dapat berperan dalam mekanisme pertahanan untuk mencegah virus turunannya meninggalkan sel dengan mengeliminasi sel yang terinfeksi. Namun, besarnya apoptosis seluler telah memicu terjadinya kerusakan organ. Akumulasi protein virus dalam RE selama replikasi juga telah menyebabkan tekanan yang dapat memicu lepasnya kalsium dan aktivasi jalur apoptosis.¹⁶

Gubler (1998) menjelaskan bahwa DBD/*Dengue Shock Syndrome* (DSS) yang terjadi disebabkan karena adanya perubahan genetik virus dengue sebagai akibat adanya tekanan selektif pada nyamuk dan manusia. Kondisi ini

menyebabkan strain virus mempunyai potensi endemis yang lebih tinggi, replikasi virus meningkat dan keganasan di dalam hospes meningkat.^{8, 17}

Dasar Pengembangan Vaksin Dengue

E (*envelope*) merupakan salah satu bagian dari protein struktural virus yang sangat penting dalam pengembangan vaksin, yaitu sebagai badan yang memproduksi antibodi netralisasi untuk protein. Non-struktural protein 1 juga telah diketahui sebagai salah satu komponen penting dalam pengembangan vaksin oleh karena kemampuannya untuk dapat diekspresi pada permukaan sel yang diinfeksi yang dapat menjadi target untuk *immune cytolysis*.¹

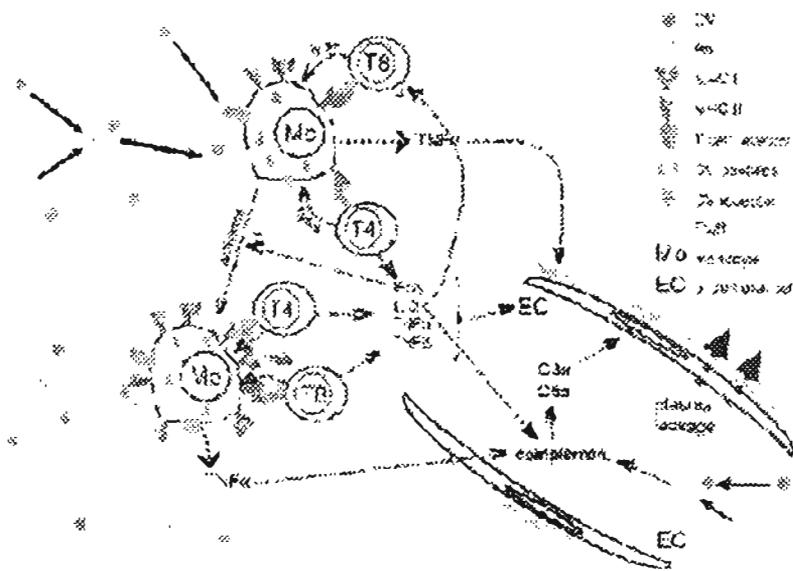
Hubungan antara infeksi virus dan mekanisme terbentuknya imunitas dalam tubuh, imunitas hospes tampaknya berkaitan erat dengan antibodi spesifik serotipe. Setelah terinfeksi virus dengue, dalam tubuh seseorang akan terbentuk imunitas jangka panjang untuk serotipe yang homolog, namun demikian dia akan berisiko terinfeksi oleh serotipe yang heterolog. Oleh karena itu suatu vaksin yang berspektrum luas harus dapat mencegah infeksi oleh seluruh serotipe yang ada. Antibodi yang terbentuk dari suatu serotipe tidak dapat menetralsisir infeksi serotipe yang lain, sehingga suatu individu secara teoritis dapat diinfeksi oleh 4 virus dengue. *Pre-existing antibody* telah menyebabkan infeksi

selanjutnya menjadi lebih ganas, bahkan dapat berakibat fatal. Kondisi ini kemudian dikenal sebagai *Antibody dependent enhancement*.^{1,2}

Infeksi pertama dianggap sebagai infeksi primer dan untuk infeksi selanjutnya dikenal sebagai infeksi sekunder. Apabila seseorang divaksin hanya dengan 1 serotipe, hal ini sama seperti halnya seseorang terkena infeksi primer dan orang tersebut akan dapat terinfeksi dengan infeksi sekunder. Suatu vaksin harus menghasilkan antibodi yang protektif melawan seluruh serotipe untuk mencegah peningkatan antibodi yang terjadi mengikuti infeksi primer dengue.^{1, 2, 4, 5}

Saat ini, pengembangan vaksin dengue masih mengalami kendala oleh karena virus ini sangat sulit ditumbuhkan dalam kultur jaringan, hal ini menyebabkan produksi vaksin inaktif tidak memungkinkan oleh karena kultur jaringan tidak dapat menghasilkan antigen virus dengue dalam jumlah yang cukup. Kurangnya model hewan coba untuk penyakit dengue juga telah menghambat evaluasi kandidat vaksin dalam kemampuannya mencegah penyakit dengue. Hewan coba hanya digunakan dalam uji imunogenisitas.¹

Ada 2 pendekatan yang digunakan dalam memproduksi suatu vaksin dengue, yaitu: a. Vaksin hidup yang telah dilemahkan (*live attenuated vaccine*); b. Vaksin hasil rekayasa (*engineered vaccine*). *Live attenuated vaccine*



Gambar 3. Model Immunopathogenesis dari Infeksi Virus Dengue dalam DBD¹⁸

saat ini telah diproduksi dan diteliti secara berkelanjutan oleh *Mahidol University*, Bangkok dan *The Walter Reed Army Institute of Research*, US. Mereka mempunyai virus dengue yang telah dilemahkan melalui virus dengue yang telah virulent yang dilalukan secara serial pada sel ginjal primer anjing atau *fetal rhesus* sel paru-paru. Ketika terjadi penurunan virulensi virus dengue melalui *serial passage*, kemampuan virus untuk menstimulasi respon imun juga akan menurun. Meskipun demikian dapat muncul bahaya yang ditimbulkan dari virus yang dilemahkan tersebut, yaitu vaksin yang dihasilkan berasal dari virus dengue yang tidak dilemahkan secara sempurna dan *over attenuation* dari virus vaksin yang dihasilkan sehingga tidak bisa menstimulasi respon imun.¹

Pada tahun 1987, panitia pengarah WHO untuk pengembangan vaksin telah mempublikasikan rencana pengembangan suatu vaksin dengue yang direkayasa secara molekuler. Pendekatan molekuler dimulai untuk memproduksi vaksin generasi kedua yang diharapkan akan dapat mengeleminasi kesulitan dan perhatian yang berkaitan dengan vaksin hidup yang telah dilemahkan. Pengembangan vaksin dengue ini menyangkut 4 hal yang utama, yaitu identifikasi epitop yang protektif, ekspresi epitop protektif, definisi molekuler dari virulensi dan vaksin yang direkayasa.¹

Epitop protektif yang telah diidentifikasi banyak terdapat pada protein E dan pada protein NS1 (ditemukan pada permukaan sel yang telah terinfeksi). Interes pada protein NS1 didasarkan pada kenyataan bahwa antibodi terhadap protein tersebut diharapkan dapat melindungi dan tidak termasuk di dalam peningkatan imun seperti terlihat pada antibodi protein E.¹

Perkembangan Vaksin Dengue

Pada prinsipnya, secara teoritis vaksin DENV yang efektif dapat dibuat, tidak seperti halnya dengan HIV dan virus hepatitis C, karena DENV tidak menyebabkan infeksi kronis. Replikasi viral efektif dikendalikan setelah periode pendek dari viremia (3-7 hari). Selain itu pada seseorang yang telah sembuh dari infeksi DENV akan memiliki kekebalan terhadap infeksi sekunder/selanjutnya dari serotipe yang homolog.^{1,7}

Meski demikian, pengembangan vaksin dengue masih belum sesuai dengan yang diharapkan dikarenakan hal-hal sebagai berikut:

1. Keganasan infeksi dengue akan meningkat pada seseorang yang memperoleh antibodi dengue secara pasif melalui transmisi maternal atau aktif akibat dari infeksi virus dengue sebelumnya yang kemudian terinfeksi kembali dengan serotipe virus yang heterolog (berbeda). Sistem imun yang terbentuk terhadap 1 atau 2 serotipe DENV ternyata justru akan dapat meningkatkan potensi menjadi lebih buruk pada kasus DBD dan DSS melalui mekanisme yang dikenal sebagai *Antibody-Dependent Enhancement (ADE)*. Agar pembuatan vaksin dapat berhasil, maka suatu vaksin dengue harus bersifat *tetravalent* dan mempunyai kemampuan secara simultan untuk dapat menimbulkan imunitas dengan level yang tinggi dan bersifat jangka panjang terhadap ke empat serotipe DENV.⁶
2. Tidak adanya binatang uji yang dapat dipergunakan untuk mengevaluasi kandidat dengue vaksin secara *in vivo* telah menyulitkan untuk dapat mengetahui dan mengevaluasi perkembangan vaksin secara tepat.⁶

Di dalam pengembangan vaksin dengue, ada hal yang sangat penting, yaitu bahwa suatu vaksin harus dapat menstimulasi respon imun baik humoral maupun seluler secara efektif. Hal ini ternyata dipengaruhi oleh dasar vaksin yang digunakan. Pengembangan vaksin yang didasarkan pada protein (*Protein-based vaccine*) akan dapat meningkatkan respon antibodi (*humoural reponse*), namun di sisi lain vaksin ini tidak mampu meningkatkan respon seluler secara efektif. Lain halnya dengan vaksin yang berdasar pada DNA dan virus, vaksin jenis ini akan dapat meningkatkan respon imun baik humoral maupun seluler, meskipun demikian vaksin yang didasarkan pada DNA (*DNA-base vaccine*) akan menghasilkan antibodi dengan titer yang relatif rendah. Induksi titer antibodi yang rendah ini justru akan meningkatkan potensi bahaya dalam konteks ADE. Vaksin yang didasarkan pada virus (*Virus-based vaccine*) telah diketahui lebih efektif kemampuannya sebagai penghubung antigen yang efisien dalam transfer gen dan dapat diproduksi dalam level tinggi dari protein antigen aslinya (secara langsung dalam sel dari hospes yang telah diimunisasi). Di samping itu, vaksin jenis ini dapat menstimulasi secara seimbang antara sistem

imun humoral dan seluler, serta dapat menimbulkan suatu imunitas jangka panjang.⁶

Penelitian terhadap vaksin DENV baik rekombinan maupun non-rekombinan yang didasarkan pada uji virus telah dilakukan secara terus-menerus baik pada monyet dan manusia. Hasilnya menunjukkan adanya perkembangan dalam strategi pembuatan formulasi vaksin *tetravalent*. Meskipun demikian, sampai saat ini, respon imun yang muncul masih belum seimbang antara keempat serotipe virus yang digunakan, biasanya respon imun ini dominan dan spesifik untuk salah satu serotipe saja.⁶

Sampai saat ini telah dikembangkan sejumlah kandidat vaksin DENV yang berdasar pada *tetravalent* virus dengue, yaitu:

a) Vaksin Konvensional

Jenis vaksin ini telah dikembangkan oleh Mahidol University di Thailand dan *The Walter Reed Army Institute for Research (WRAIR)* di USA. Vaksin jenis ini dibuat dengan melemahkan keempat strain virus yang akan digunakan melalui *repeated serial passaging* pada *non-permissive cell line*. Hasilnya kemudian dicampur secara fisik untuk menghasilkan formulasi *tetravalent*. Vaksin yang diproduksi oleh Mahidol University telah dibeli lisensinya oleh Aventis Pasteur (AvP) di Perancis untuk diproduksi dalam skala besar dengan menetapkan GMP (*Good Manufacturing Practice*). Uji klinis pertama untuk menggunakan vaksin *tetravalent* Mahidol/AvP ini dilakukan pada sukarelawan Amerika yang menunjukkan hasil terbentuknya respon antibodi secara langsung, tetapi hanya dominan terhadap DEN-3, tetapi terhadap ketiga serotipe virus lainnya titer antibodi yang terbentuk sangat rendah, bahkan ada yang tidak terdeteksi sama sekali. Vaksin *tetravalent* yang dihasilkan menunjukkan hasil adanya preferensi replikasi DEN-3.⁶

Beberapa reformulasi vaksin *tetravalent* lainnya yang telah dibuat juga telah dievaluasi untuk mendapatkan respon imun yang lebih seimbang dari masing-masing serotipe. Vaksin WRAIR yang telah dibeli lisensinya untuk GlaxoSmithKline di Belgia, telah diuji pada studi fase I terhadap 50 sukarelawan dewasa dengan menggunakan enam belas formulasi vaksin yang berbeda. Hasil uji ini menunjukkan serokonversi 80-90% terhadap seluruh serotipe virus dengue setelah dilakukan dua kali imunisasi.⁶

b) Vaksin Dengue Rekombinan Berdasar pada Flavivirus

Teknologi yang lebih modern dalam pembuatan vaksin dengue adalah dengan menggunakan *Infectious clone technology*. Teknologi ini memungkinkan untuk dapat memulihkan infeksi virus dengue menggunakan sel yang ditransfer secara *in vitro* dengan transcript RNA yang berasal dari klon *full-length* cDNA dari genom virus dengue.⁶

Dengan menggunakan teknologi ini, virus rekombinan yang infeksiif akan dapat dibuat dari klon cDNA yang telah direkayasa untuk membawa hasil mutasi virus dengue yang telah dilemahkan. Dengan metode ini juga memungkinkan diproduksi *monovalent chimeric virus* melalui penggantian struktur gen dari *full-length* klon cDNA dengan serotipe virus dengue yang berbeda. Pendekatan teknologi yang berbasis *infectious clone* ini telah difokuskan khususnya pada selubung (E) dari virus dengue (struktur protein virus utama), oleh karena E merupakan bagian yang paling penting dari virus yang berperan sebagai ligand yang akan melekat pada reseptor permukaan sel hospes, sehingga virus dapat masuk ke dalam sel hospes. Di samping itu, E juga merupakan target utama dari respon antibodi netralisasi. Sebagian besar dari desain vaksin juga dilengkapi dengan tambahan protein struktural virus lainnya, misalnya prM. Protein prM ini berperan dalam perbaikan struktural/integritas antigen dari protein E.⁶

c) Vaksin *Intertypic chimeric*

Pembuatan vaksin ini dipelopori oleh Lai's group pada *The National Institute of Health*, Bethesda, USA. Gen struktural dari kopi cDNA yang berasal dari suatu serotipe virus dengue yang telah dilemahkan diganti dengan gen yang bersesuaian yang berasal dari serotipe virus dengue lainnya. Hasil dari *Intertypic chimeric* ini adalah *monovalent* yang akan dapat meningkatkan respon antibodi spesifik terhadap serotipe dari gen struktural yang dihasilkan. Saat ini di dalam pengembangan vaksin virus *intertypic* dilakukan dengan memfokuskan penggunaan virus serotipe DEN-1, DEN-2 dan DEN-4 yang telah dilemahkan sebagai vektor untuk membawa gen struktural yang *heterotype*. Sebagai contoh, gen struktural dari suatu kopi cDNA dari DEN-2 kandidat vaksin Mahidol PDK-53 (yang telah dilemahkan

melalui *repeated serial passaging* pada sel ginjal anjing dan telah diuji pada sukarelawan Thailand dan Amerika) diganti dengan gen virus lain yang bersesuaian, yaitu DEN-1 menggunakan teknologi *infectious clone*. Suatu mutan DEN-4 yang membawa suatu delesi 30 nukleotida pada 3' *untranslated region* (UTR) telah diuji pada 20 sukarelawan yang hanya menimbulkan gejala minor dengan 100% menetralkan serokonversi antibodi.⁶

Imunogenisitas yang tinggi dan lemahnya reaktogenisitas yang ditimbulkan dari virus telah memungkinkan penggunaan virus ini digunakan sebagai vektor vaksin virus *chimeric* yang mengkode protein struktural DEN-1, DEN-2 dan DEN-3. Beberapa hasil penelitian terbaru menunjukkan, delesi 30-nukleotida pada bagian TL2 DEN-1 juga telah dapat disisipkan kedalam 3' UTR pada *wild-type* DEN-1 dan berhasil dilemahkan. Hasil ini telah membuka kemungkinan bahwa suatu vaksin tetravalent dapat dibuat dengan memasukkan delesi 30 nukleotida ke dalam virus dengue tipe liar pada semua serotipe.⁶

d) Vaksin ChimeriVax

Vaksin flavivirus yang saat ini banyak dikenal dan paling berhasil digunakan adalah vaksin yang menggunakan strain 17D virus *Yellow Fever* yang telah dilemahkan. Imunisasi tunggal dengan menggunakan strain vaksin YF17D telah berhasil meningkatkan imunitas seseorang terhadap infeksi *Yellow Fever* sampai hampir mencapai 100%. Dengan hasil tersebut, Acambis USA telah mengembangkan suatu vaksin dengue menggunakan vektor YF17D (yang dikenal sebagai teknologi ChimeriVax). Dalam teknologi ini, gen struktural (prM dan E) dari YF17D didalam clon cDNA diganti dengan gen yang bersesuaian dari virus dengue. Acambis telah membuat empat vaksin virus *chimeric monovalent* menggunakan teknologi ini (YF/DEN1-DEN4) yang masing-masing mengkode gen struktural terhadap satu dari 4 serotipe virus dengue. Hasil uji imunisasi dengan formulasi *tetravalent* vaksin *chimeric* YF/DEN menggunakan hewan coba kera secara langsung menunjukkan respon imun tertinggi melawan virus YF/DEN-2. Pada dosis yang telah ditentukan dalam pengujian menggunakan vaksin *chimeric* YF/DEN-2 telah menghasilkan suatu respon imun yang lebih seimbang terhadap virus DEN-1, DEN-2 dan DEN-3, tetapi menimbulkan respon yang lebih tinggi terhadap virus DEN-4. Sampai saat ini

masih dilakukan kajian dengan menambah formulasi yang kemudian akan diuji kembali pada monyet sebelum diuji pada pengujian fase I manusia.⁶

e) Vaksin Dengue Rekombinan Menggunakan Vektor non-Flavivirus

Berbeda dengan penggunaan flavivirus yang telah dilemahkan yang berasal dari serotype virus dengue yang berbeda maupun penggunaan virus YF, sistem vektor virus heterolog yang selama ini telah dikenal dapat digunakan untuk mengekspresi antigen struktural dengue. Beberapa yang utama diantaranya adalah vektor vaksin yang ada berasal dari *baculovirus* dan *vaccinia virus*.⁶

Penggunaan vektor *vaccinia* rekombinan yang ditumpangi gen berbeda dari flavivirus telah berhasil dibuat dan diuji sebagai vaksin pada binatang model pada kurun waktu akhir tahun 1980-an sampai dengan awal tahun 1990-an. Mencit yang telah diimunisasi dengan menggunakan vektor *vaccinia* rekombinan akan mengkode struktural protein prM dan E serta NS1 pada virus DEN-4 akan melindungi terhadap *lethal dengue encephalitis*. Pada laporan lainnya, penggunaan rekombinan *vaccinia* yang diekspresikan pada suatu *carboxy-terminally* yang telah dimampatkan melawan selubung DEN-4 menunjukkan hasil yang lebih imunogenik daripada rekombinan yang mengekspresi *full-length* selubung (E) DEN-4. Co-ekspresi prM dan E menggunakan vektor *vaccinia* telah memicu timbulnya sekresi partikel sub-viral ekstraselular yang mampu meningkatkan antibodi netralisasi sampai pada level yang tinggi. Meskipun demikian keamanan penggunaan vaksin dengan vektor *vaccinia* masih terus diteliti oleh karena adanya kasus efek samping penggunaan vektor vaksin sejenis yang tidak diharapkan yang pernah terjadi pada saat WHO melaksanakan program eradikasi *smallpox*.⁶

Sebagian besar vektor *vaccinia* rekombinan didesain untuk mengekspresikan antigen dengue yang didasarkan pada virulensi strain WR. Namun, demikian hal ini tidak dapat diijinkan dalam penggunaan pada manusia. Namun pada beberapa tahun berikutnya, telah dikembangkan vektor *vaccinia* yang sudah sangat dilemahkan yang kemudian dikenal sebagai *modified vaccinia virus Ankara* (MVA) sebagai vektor potensial vaksin dengue. Hasil studi paling kini mengenai penggunaan MVA untuk mengekspresi *carboxy-terminally truncated* melawan protein E DEN-2

dan DEN-4 menunjukkan bahwa mencit telah berhasil diimunisasi dengan MVA-DEN 2E, tetapi tidak dengan MVA-DEN-4E, disebabkan oleh adanya respon antibody netralisasi.⁶

f) Vektor Adenovirus

Pengembangan vaksin dengue dengan menggunakan vektor *Adenovirus* (Ad) (*Adenovirus-based vaccine vector*) untuk mengekspresi antigen dengue belum banyak dilakukan meskipun vektor ini memiliki banyak kelebihan. Faktor utama di dalam mendukung eksplorasi vektor-Ad pada kandidat vaksin dengue adalah faktor keamanan yang telah terbukti dari penggunaan Adenovirus. Vaksin hidup Adenovirus telah terbukti berhasil dan aman digunakan dalam imunisasi per oral pada jutaan calon tentara Amerika Serikat. Vektor vaksin menggunakan adenovirus ini akan dapat meningkatkan titer yang sangat tinggi, yaitu mencapai 10^{11-12} plaque forming unit (pfu/ml), tidak seperti flavivirus yang hanya menghasilkan titer yang berkisar antara 10^6-7 pfu/ml di dalam *permissive cell lines* dan dapat dimurnikan relatif lebih mudah menggunakan metode Kolom Kromatografi. Sejumlah antigen virus yang berasal dari beberapa virus yang berbeda telah diekspresi menggunakan vektor Adenovirus.⁶

Rekombinan menggunakan vektor Adenovirus ini telah diuji pada beberapa binatang model dan telah menunjukkan peningkatan imunitas humoral, *cell-mediated* dan imunitas mukosa. Lagipula, proteksi melawan virus telah ditunjukkan pada sejumlah model penelitian. Dibandingkan dengan penggunaan vektor *Poxvirus* yang telah dilemahkan seperti misalnya *New York Vaccinia* (NYVAC) dan *Modified vaccinia virus Ankara* (MVA) telah menunjukkan bahwa Adenovirus lebih aman dan lebih berhasil. Penelitian pendahuluan yang dilakukan oleh Laisawal, *et. al.* menunjukkan bahwa suatu rekombinan Adenovirus mengekspresi protein DEN-2E memungkinkan untuk dapat meningkatkan antigen spesifik antibody penetralsasi.⁶

Adenovirus merupakan virus yang terdapat di mana-mana, suatu penggunaan vaksin yang sudah dilemahkan yang berdasar Adenovirus merupakan isu pada awal imunitas Adenovirus. Co-injeksi menggunakan busa gel (collogen-based matrix) dengan antigen yang mengkode vaksin Adenovirus telah ditunjukkan untuk menghilangkan efek penghambatan dari imunitas Adenovirus.⁶

Kesimpulan

Vaksin dengue saat ini sangat dibutuhkan untuk menekan penyebaran penyakit dengue secara global. Sampai saat ini belum ada vaksin yang diijinkan digunakan pada manusia. Pengembangan suatu vaksin dengue masih belum sesuai dengan yang diharapkan, oleh karena saat ini dibutuhkan vaksin yang solid dan dapat melindungi dari infeksi tetravalent virus dengue dalam jangka panjang. Di samping itu, sangat sedikit model hewan coba yang dapat digunakan untuk mengevaluasi pengujian vaksin.

Penelitian vaksin dengue difokuskan pada beberapa strategi. Fokus utamanya adalah pada penggunaan vaksin hidup yang telah dilemahkan dan vaksin yang diperoleh dari klon virus dengue infeksi. Saat ini, enam vaksin berdasar virus (*virus-based vaccine*) yang berbeda sedang dalam tahap pengembangan lanjut. Dua diantaranya didasarkan pada pengembangan vaksin hidup yang telah dilemahkan menggunakan kultur jaringan konvensional, padahal vaksin virus rekombinan *chimeric* telah dikembangkan menggunakan *infectious clone technology*. Dari seluruh contoh di atas, vaksin virus tersebut merupakan vaksin monovalent dalam arti pada setiap satu vaksin, spesifik terhadap satu serotype dengue virus.

Suatu vaksin tetravalent, didasarkan pada formula vaksin yang diproduksi dari campuran seluruh vaksin *monovalent* (ada 4 vaksin *monovalent* dalam dengue). Studi terkini menunjukkan bahwa formulasi pada vaksin *tetravalent* dengue hidup yang telah dilemahkan dan pada vaksin *tetravalent ChimeriVax* telah menimbulkan ketidakseimbangan respon imun akibat efek percampuran virus yang dihasilkan. Kejadian ini telah mengarah pada respon imun yang dominan hanya terhadap satu serotype (khususnya dalam kasus vaksin dengue *ChimeriVax*), mengutamakan keterbatasan, dan yang lebih penting, resiko yang berhubungan dengan percampuran empat vaksin virus *monovalent* untuk membuat suatu vaksin *tetravalent*.

Usaha untuk mengoptimalkan formulasi *tetravalent*, resiko perpaduan campuran didalam strategi untuk menghasilkan vaksin dengue *tetravalent* menguatkan investigasi dari rekombinan sistem vektor virus lain telah memunculkan suatu *single vaccine vector* yang memungkinkan timbulnya proteksi *tetravalent*.

Kemajuan yang menjanjikan dalam pengembangan strategi vaksin alternatif, khususnya vaksin yang menggunakan vektor hidup mempunyai potensi untuk dikembangkan di dalam komponen tunggal vaksin yang bersesuaian dengan seluruh kunci antigen dari seluruh serotipe virus dengue. Vektor viral berasal dari virus vaccinia dan adenovirus yang memiliki kapasitas sisipan yang cukup besar dan sebagai kandidat potensial untuk mengeksplorasi kemungkinan pengembangan seperti misalnya suatu *single tetravalent vaccine vector*.

Dengan perkembangan vaksin yang sedemikian kompleks dan upaya yang telah dilakukan oleh para ilmuwan dunia dalam rangka menemukan vaksin dengue yang efektif dan efisien, Indonesia tampaknya juga tidak mau ketinggalan, seperti halnya yang telah dilakukan oleh US Namru-2 dan *Tropical Diseases Centre (TDC)* Universitas Airlangga sejak beberapa tahun lalu. Namun demikian, masih diperlukan lebih banyak lembaga penelitian/universitas di Indonesia yang juga diharapkan untuk dapat mengembangkan vaksin terhadap penyakit yang telah menyebabkan kematian cukup tinggi setiap tahunnya di Indonesia ini. Semoga dalam kurun waktu yang tidak terlalu lama semakin banyak ilmuwan dan lembaga penelitian Indonesia yang memiliki kemampuan di bidang vaksin dengue untuk lebih dapat menciptakan hasil penelitian dengue yang benar-benar membantu dan bermanfaat bagi masyarakat luas lebih banyak lagi. Kita tunggu hasilnya.

Daftar Pustaka

1. Jennings, G.B. *Dengue vaccines*. Phil J Microbiol Infect Dis. 1993, 22(1):28-30
2. Rothman, A.L. *Dengue : defining protective versus pathologic immunity*. The Journal of Clin Investigation 2004, 113(7): 946-950.
3. WHO. *Dengue haemorrhagic fever: Diagnosis, treatment, prevention and control, 2nd edition*. World Health Organization, Geneva; 1997.
4. Halstead, S.B., Heinz, F.X., Barrett, A.D.T., Roehrig, J.T. *Dengue Virus: Molecular Basis of Cell Entry and Pathogenesis, 25-27 June 2003, Vienna, Austria*. Vaccine, 2005, 23: 849-856.
5. Secma, Jain, S.K. *Molecular Mechanism of Pathogenesis of Dengue Virus: Entry and Fusion with Target Cell*. Indian J. Of Clinical Biochemistry, 2005, 20(2): 92-103.
6. Swaminathan, S., Khanna, N. *Viral Vaccines for Dengue: The Present and The Future*. Dengue bulletin, 2003, 27:181-191.
7. Bielefeldt-Ohmann, H., Meyer, M., Fitzpatrick, D.R., Mackenzie, J.S. *Dengue Virus Binding to Leukocyte Cell Lines: Receptor Usage Differs Between Cell Types and Virus Strains*. Virus Res., 2001, 60: 7381-7389.
8. Gubler, D.J. *Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever*. Clinical Microbiology Review, 1998, 11:480-496.
9. Kurane, I., Ennis, F.A. *Immunopathogenesis of Dengue Infections In "Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever"* eds. D.J. Gubler & G. Kuno. CAB International, New York; 1997, pp. 273-290.
10. Rothman, A.L. *Viral Pathogenesis of Dengue Infection In "Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever"* eds. D.J. Gubler & G. Kuno. CAB International, New York; 1997, pp. 245-271.
11. Vaughn, D.W., Green, S., Kalayanarooj, S., Innis, B.L., Nimmannitya, S., Suntayakorn, S., Endy, T.P., Raengsakulrach, B., Rothman, A.L., Ennis, F.A., Nisalak, A. *Dengue Viremia Titer, Antibody Response Pattern and Virus Serotype Correlate with Disease Severity*. The J. Of Infectious Diseases, 2000, 181:2-9.
12. Rothman, A.L., Ennis, F.A. *Immunopathogenesis of Dengue Hemorrhagic Fever*. Virology, 1999, 257:1-6.
13. Halstead, S.B. *Neutralization and Antibody-Dependent Enhancement of Dengue Viruses In "The Flavivirus: Pathogenesis and Immunity"* edited by Thomas J. Chambers and Thomas, P.M. Advances in Virus Research Volume 60, Elsevier Academic Press; 2003, pp. 421-467.
14. Innis, B.L. *Antibody Responses to Dengue Virus Infection In "Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever"* eds D.J. Gubler & G. Kuno. CAB International, New York; 1997, pp. 221-243.
15. Chaturvedi, U.C., Dhawan, R., Mukerjee, R. *Immunosuppression and Cytotoxicity of Dengue Infection in The Mouse Model In "Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever"*

-
- edited by D.J. Gubler & G. Kuno. CAB International, New York; 1997, pp. 291-231.
16. Depres, P., Flamand, M., Ceccaldi, P.E., Deubel, V. *Human Isolates of Dengue Type I Virus Induce Apoptosis in Mouse Neuroblastoma Cells*. *J. Of Virology*, 1996, 70:4090-4096.
 17. Edgil, D., Polacek, C., Harris, E. *Dengue Virus Utilizes a Novel Strategy for Translation Initiation When Cap-Dependent Translation is Inhibited*. *Journal of Virology*, 2006, 80:2976-2986.
 18. Keat, C.M. *Dengue Virus Infection*. National University of Singapore; 2006, pp.01-25
 19. Green, S., Vaughn, D.W., Kalayaharooj, S., Nimmannitya, S., Suntayakorn, S., Nisalak, A., Lew, R., Innis, B.L., Kurane, I., Rothman, A.L., Ennis, F.A. *Early Immune Activation in Acute Dengue is Related to Development of Plasma Leakage and Disease Severity*. *American J. Of Epidemiology*, 1999, 156:52-59.
 20. Anonim. *Mikrobiologi Kedokteran*. Fakultas Kedokteran UI, 2001. Jakarta