

# Perkembangan Vaksin Hepatitis B

Usman Suwandi

*Pusat Penelitian dan Pengembangan PT. Kalbe Farma, Jakarta*

## PENDAHULUAN

Infeksi virus hepatitis B dapat menyebabkan penyakit hati menahun, sirosis dan karsinoma hepatoselular. Di seluruh dunia diperkirakan ada lebih 200 juta orang sebagai karier virus hepatitis B. Oleh karena itu, imunisasi diperlukan terutama bagi yang mempunyai risiko infeksi tinggi, antara lain berdasarkan pola epidemiologi, faktor sosio ekonomi, budaya dan lingkungan. Selain itu adanya transmisi perinatal virus hepatitis B di beberapa tempat, menunjukkan pentingnya imunisasi bayi, terutama yang lahir dari ibu karier.

Tujuan vaksinasi hepatitis B antara lain untuk mencegah penyakit klinis dan transmisi virus hepatitis B ke individu lain. Faktor yang mempengaruhi imunogenisitas pada waktu imunisasi antara lain faktor *host* dan faktor imunisasi. Faktor *host* meliputi umur, lingkungan dan genetik, sedang faktor imunisasi meliputi tempat inokulasi, dosis vaksin dan program imunisasi.

Virus hepatitis B hanya hidup di dalam sel dan plasma manusia (dan simpanse). Virus ini tidak dapat berkembang biak pada media biakan standar yang biasa digunakan membiakkan virus untuk pembuatan vaksin konvensional. Kesulitan ini sedikit menghambat perkembangan pembuatan vaksin hepatitis B.

Pelaksanaan imunisasi aktif terhadap virus hepatitis B pada manusia, pertama kali dilakukan oleh Krugman dan koleganya tahun 1971 yaitu menggunakan sediaan serum yang diperoleh dari karier virus hepatitis B dan diinaktivasi menggunakan panas. Hasilnya 20 dari 29 anak terlindung dari infeksi virus hepatitis B. Imunitas dijumpai pada anak-anak yang mempunyai antibodi terhadap Hepatitis B Surface Antigen (HBs Ag). Hasil ini memacu perkembangan pembuatan vaksin hepatitis B lebih maju, terutama untuk produksi skala besar dari plasma karier.

Vaksin HBs Ag yang dimurnikan dari plasma karier dan inaktivasi formalin/panas telah diproduksi di beberapa laborato-

rium. Namun dengan terbatasnya persediaan plasma, perlunya seleksi dan kontrol yang ketat untuk mendapatkan vaksin murni dan bebas sumber infeksi lain, maka pendekatan lain terus dicari. Problem ini akhirnya dapat teratasi dengan pendekatan rekombinan DNA. Salah satu sintesis HBs Ag yang telah berhasil dari sel ragi (*yeast*) rekombinan. Partikel ini memperlihatkan sifat imunogenik pada binatang percobaan; pengujian pada manusia telah berhasil menginduksi anti HBs dan melindungi dari infeksi virus hepatitis B.

Saat ini setidaknya ada 3 sumber partikel HBs Ag yang digunakan untuk vaksinasi hepatitis B. Pertama HBs Ag dimurnikan dari plasma karier. Metode ini telah berhasil dan efikasinya tidak disangsikan. Dua sumber lain yaitu melalui pendekatan teknologi rekombinan DNA, dengan memasukkan gen virus hepatitis B pengkode HBs Ag ke dalam sel ragi dan sel mamalia. Selain itu, HBs Ag juga dapat disekresi oleh *E. coli*, namun jumlahnya relatif kecil, demikian juga sifat antigeniknya.

Walaupun vaksin hepatitis B sudah dapat diproduksi dan manfaat serta efikasinya tidak diragukan, para ahli masih disibukkan dengan berbagai percobaan bagi perkembangan vaksin ini. Usaha mendapatkan vaksin hidup juga dilakukan, misalnya menggunakan virus *vaccinia*. Percobaan untuk menguji titer antibodi yang terinduksi dilakukan pada berbagai hewan percobaan dan hasilnya cukup menggembirakan. Penelitian pembuatan antigen secara kimia juga telah berhasil mendapatkan peptida sintetik yang mampu menginduksi antibodi yang menetralkan HBs Ag asli.

## VAKSIN DARI PLASMA KARIER

Penggunaan vaksin hepatitis B yang diekstraksi dari plasma manusia dimulai sejak keberhasilan penelitian Krugman dan

koleganya tahun 1971. Mereka menggunakan serum yang mengandung virus hepatitis B. Serum ini mereka encerkan 1:10 dan diinaktivasi panas 90° C selama 1 menit. Vaksinasi dilakukan pada 29 anak, hasilnya lebih dari separuh terlindung dari infeksi hepatitis B. Pengembangan vaksin ini selanjutnya menggunakan antigen lain untuk imunisasi aktif yaitu "Hepatitis B Surface Antigen" (HBs Ag). Antigen ini merupakan permukaan virus yang diambil dan dimurnikan dari plasma manusia karier. Vaksin HBs Ag ini merupakan partikel 22 nm mumi, diinaktivasi panas, diadsorpsi alum dan bebas dari asam nukleat; dimurnikan melalui tahap presipitasi, ultrasentrifugasi, gel filtrasi dan afinitas kromatografi.

Vaksin HBs Ag mempunyai keamanan dan imunogenisitas baik. Setelah mengalami berbagai perbaikan, lebih dari 30 juta dosis telah tersebar di dunia dan memperlihatkan keamanan yang menggembirakan. Hal ini dicapai karena ketatnya inaktivasi dan purifikasi untuk memusnahkan sumber infeksi serta pengujian kontrol kualitas untuk menjamin kemurnian produk.

### WAKSIN DARI SEL YEAST DAN SEL MAMALIA

Kemajuan di bidang genetika molekuler dan kimia asam nukleat, telah memungkinkan identifikasi dan analisis gen pengkode substansi aktif, transfer di antara organisme dan memproduksinya di bawah kondisi terkontrol. Gen pengkode produk tertentu dapat diisolasi dan dibiakkan untuk memproduksi zat tersebut, dengan cara memasukkan molekul DNA (alami atau sintetik) ke dalam vektor yang sesuai, kemudian dimasukkan ke dalam *host*.

Teknik rekombinan ini telah membuka jalan untuk mengembangkan produksi vaksin, terutama sumber infeksi yang belum tersedia vaksinnya dan untuk meningkatkan vaksin yang ada. Pendekatan baru terhadap perkembangan vaksin ini sangat berharga terutama untuk mikroorganisme/virus yang tidak dapat dibialdcan dengan metoda yang ada, seperti virus hepatitis B. Teknologi rekombinan DNA ini telah berhasil digunakan untuk memproduksi HBs Ag dengan berbagai sel antara lain sel prokariot seperti *E. coli* dan *B. subtilis*, sel eukariot seperti sel *S. cerevisiae*, sel CHO dan sebagainya.

Vaksin hepatitis B yang diproduksi sel ragi rekombinan telah menjalani pengujian keamanan, imunogenisitas dan evaluasi klinis. Hasilnya menunjukkan bahwa vaksin ini aman, antigenik dan relatif bebas efek samping yang merugikan, bahkan vaksin ini telah dilisensikan dan diproduksi di berbagai negara. Salah satu keuntungan vaksin dari sel ragi dibanding dari plasma yaitu siklus produksinya dapat dikurangi, dan konsistensi dari *batch* ke *batch* lebih mudah diperoleh. Bahkan antigen yang berasal dari sel ragi juga telah dicoba disiapkan dalam bentuk *micellar*. Vaksin polipeptida *micelle* ini di dalam laboratorium dilaporkan lebih antigenik.

HBs Ag dilepaskan dari sel dengan *homogeniser* atau *disruption* menggunakan *glass bead*. Pemurnian melalui tahap *clarification*, ultrafiltrasi, kromatografi dan ultrasentrifugasi serta diadsorpsi dengan alum hidroksida; sebagai pengawet ditambahkan thiomerosal. Karakterisasi partikel dilakukan dengan

membandingkan HBs Ag dari plasma antara lain meliputi berat molekul, komposisi asam amino, densitas dalam CsCl<sub>2</sub> dan sebagainya. Analisis imunologis menggunakan antibodi monoklonal memperlihatkan vaksin dari plasma dan ragi mengandung epitope yang berperan menginduksi antibodi setelah vaksinasi.

Vaksin HBs Ag rekombinan juga diproduksi menggunakan sel mamalia yaitu sel *Chinese Hamster Ovary* (CHO). Gen HBs Ag dimasukkan ke dalam sel CHO dan sel ini dapat mensintesis dan mensekresikan partikel HBs Ag 22 nm. *Cell line* CHO dapat mensintesis HBs Ag 15 mcg/10<sup>6</sup> sel/hari. Bahkan bila *cell line* ditumbuhkan pada fase stasioner, mereka dapat mensintesis secara terus menerus dan isolasi HBs Ag dapat dilakukan berulang-ulang dari supernat biakan sel selama 2 – 3 minggu. HBs Ag yang dimurnikan dari supernat biakan sel CHO terdiri dari partikel 22 nm yang sangat homogen dan identik dengan HBs Ag dari serum manusia.

Pada percobaan imunogenisitas pada *guinea pig*, ternyata 50% binatang mempunyai antibodi HBs sesudah imunisasi HBs Ag 1,5 ug dari sel CHO dan 2 ug HBs Ag dari serum manusia. Pada simpanse, vaksin HBs Ag rekombinan dari sel CHO terlihat lebih imunogenik daripada vaksin yang diperoleh dari ragi. Selain itu simpanse yang divaksinasi dengan vaksin dari sel CHO mempunyai respon imun seluler dan binatang yang divaksinasi dengan HBs Ag rekombinan (subtipe ad) terlindung dari infeksi virus HB subtipe ad & ay.

Jelas bahwa sel CHO rekombinan dapat mensekresikan partikel HBs Ag pada kondisi biakan tertentu dalam bentuk partikel 22 nm yang secara morfologik, biokemik dan antigenik identik dengan HB sAg plasma. Hasil penelitian pendahuluan melaporkan bahwa antibodi yang diinduksi setelah 3 bulan infeksi ke tiga, lebih superior daripada vaksin dari plasma (18,892 MIU/ml vs. 7,586 MIU/ml). Walaupun hasil ini memberikan harapan, penggunaan *cell line* CHO untuk memproduksi vaksin hepatitis B masih dikhawatirkan karena adanya kemungkinan potensi onkogenik. Untuk menghindari masalah ini, para ahli sudah mencoba menggunakan virus insekta (baculovirus) sebagai vektor dalam biakan sel insekta atau larva. Vektor ini tidak patogenik terhadap vertebrata dan tanaman. Protein disekresikan dalam jumlah relatif besardengan interval waktu lebih singkat. Perkembangan sistem ini dan aplikasinya untuk produksi vaksin di masa mendatang mungkin sangat berharga.

### WAKSIN VACCINIA

Imunisasi dengan satu kali inokulasi merupakan salah satu cara vaksinasi yang sangat didambakan terutama untuk vaksinasi masal dengan populasi eukup besar. Saat ini para peneliti telah berusaha mendapatkan vaksin hidup terhadap hepatitis B menggunakan virus *vaccinia*. Vaksin hidup ini sangat potensial dan telah digunakan untuk memproduksi vaksin hepatitis B, herpes simpleks, rabies dan lain-lain di dalam laboratorium.

Percobaan pendahuluan pada kelinci telah menyimpulkan bahwa penggunaan virus *vaccinia* rekombinan untuk vaksinasi sangat mungkin. Karakteristik biofisik dan biokimia partikel

antigenik yang disekresikan oleh virus ini identik dengan HBs Ag asli. Kelinci dan binatang laboratorium lain yang diinokulasi dengan virus hibrida ini mampu memproduksi anti-HBs. Simpanse yang divaksinasi dengan virus *vaccinia* rekombinan terlindung dari infeksi virus hepatitis B.

Beberapa keuntungan virus *vaccinia* rekombinan untuk memproduksi vaksin antara lain biaya produksinya relatif lebih rendah, cara vaksinasi relatif lebih mudah, stabilitas baik, mempunyai *shelf life* panjang, tidak onkogenik dan tidak hersifat laten.

## WAKSIN POLIPEPTIDA DAN PEPTIDA SINTETIK

Partikel HBs Ag 22 nm telah terbukti merupakan imunogen yang baik, namun penelitian lebih lanjut telah memperlihatkan bahwa komponen imunogenik tersebut mungkin merupakan bagian dari HBs Ag kompleks. Para ahli akhirnya dapat memperoleh 2 polipeptida dari partikel HBs Ag murni. Kedua polipeptida mengandung determinan antigenik hepatitis B. Pertama berupa polipeptida dengan BM 25.000 – 26.000 (P25) dan bentuk glikosilatnya dengan BM 28.000 – 30.000 (GP 30). Keduanya ternyata merupakan antigen yang efektif. Da purifikasi peptida ini akhirnya diperoleh antigen dalam bentuk *micellar*.

Pada pengujian potensi pada mencit, vaksin polipeptida subunit ini ternyata menimbulkan respon antibodi lebih kuat daripada antigen partikel 22 nm utuh. Vaksin ini telah menjalankan pengujian keamanan dan efrkasi pada primata non manusia dan sedang dikembangkan untuk uji klinis. Vaksin polipeptida *micelle* ini juga telah dibuat dari HBs Ag yang dihasilkan oleh sel ragi dan sel mamalia rekombinan.

Keberhasilan isolasi polipeptida p25 dan gp30 dari HBsAg murni dan bukti bahwa polipeptida tersebut mengandung determinan antigen yang mampu menginduksi anti HBs, telah mendorong para ahli untuk mensintesis peptida tersebut secara kimia. Di swiping itu, dorongan juga diperkuat dengan keberhasilan peptida sintetik menginduksi antibodi penetral bakteri dan virus tanaman. Vaksin peptida sintetik pertama tersebut dibuat untuk *tobacco mosaic virus*, sesudah mengidentifikasi determinan antigeniknya dan rangkaian asam aminonya. Rangkaian asam amino tersebut ternyata dapat dibuat sintetik dan mampu menginduksi antibodi dalam binatang percobaan.

Beberapa laboratorium akhirnya berhasil membuat peptida sintetik yang mengandung rangkaian asam amino identik dengan molekul p25 HBs Ag. Respon antibodi terhadap peptida ini muncul 1 – 2 minggu sesudah imunisasi primer dan semua binatang menginduksi antibodi sesudah inokulasi kedua. Mencit yang diimunisasi secara intraperitoneal, menginduksi anti HBs setelah 7 – 14 hari inokulasi.

Perkembangan vaksin polipeptida yang disintesis secara kimia memberikan banyak keuntungan antara lain dapat memproduksi imunogen yang relatif murah, aman dan *uniform* secara kimia, sehingga dapat menggantikan vaksin yang ada saat ini, yang relatif kurang murni atau mungkin mengandung determinan antigen mikroba lain.

## PENUTUP

Tidak dapat dipungkiri, betapa besar minat para ahli untuk mengembangkan vaksin hepatitis B. Hal ini dapat dimengerti, karena hepatitis B merupakan penyakit yang tersebar di berbagai penjuru dunia dan akibat yang dapat di timbulkannya bagi penderita penyakit ini seperti sirosis, penyakit hati kronis, kanker dan sebagainya. Pengembangan vaksin ini menjadi lebih menarik dengan kemajuan bidang pendukung yang begitu pesat seperti rekombinan DNA, antibodi monoklonal, sintesis kimia oligopeptida, pemrograman komputer, kristalografi, sehingga struktur protein mudah digambarkan dan determinan antigen mudah ditentukan.

Berangkat dari antigen virus yang diekstrak dari plasma manusia karier, vaksin hepatitis B mulai dikembangkan. Antigen yang lebih spesifik diidentifikasi dan diisolasi, sehingga diperoleh partikel HBs Af 22 nm yang mempunyai sifat imunogenik dan dapat digunakan untuk vaksinasi. Karena terbatasnya donor dan rumitnya purifikasi serta keamanan yang masih disangsikan walaupun tak terbukti, para ahli mulai memanfaatkan teknologi rekombinan DNA untuk membuat vaksin hepatitis B. Vaksin rekombinan pertama yang dipasarkan yaitu antigen HBs Ag yang diproduksi oleh sel ragi rekombinan. Vaksin ini sudah terbukti manfaatnya. Untuk mencari vaksin yang imunogenik lebih kuat, maka dicoba sel lain sebagai *host* dan didapatkan sel mamalia *Chinese Hamster Ovary*. Sel *E. coli* juga dapat mengekspresikan HBs Ag, tetapi titernya terlalu rendah.

Dengan vaksin yang sudah ada, para ahli masih disibukkan mencari kemungkinan lain untuk memproduksi vaksin ini. Dari hasil analisa HBs Ag, didapatkan polipeptida p25 dan bentuk glikosilatnya gp30 yang mengandung determinan antigen, sehingga dapat digunakan sebagai vaksin. Dengan mengetahui rangkaian asam amino penyusunnya, maka para ahli dapat membuat peptida secara kimia. Dalam berbagai pengujian ternyata peptida sintetik mampu menginduksi antibodi terhadap antigen hepatitis B. Tentu keberhasilan ini sangat menggembirakan, karena bila vaksin ini dibuat secara kimia, maka homogenitas dan kemumiannya tak perlu diragukan.

Vaksin hidup menggunakan virus rekombinan juga telah diuji. Mereka menggunakan virus *vaccinia* sebagai vektor. Vaksin ini sudah diuji dengan berbagai hewan percobaan dan hasilnya cukup menggembirakan. Apabila pendekatan ini berhasil untuk pembuatan vaksin komersial, tentu akan memberi banyak keuntungan seperti cara inokulasi yang relatif mudah, stabilita, *shelf – life* dan sebagainya.

Selain itu ada lagi pendekatan pembuatan vaksin hepatitis B menggunakan antibodi sebagai imunogen vaksin. Antibodi ini diproduksi dengan mengimunisasi binatang menggunakan antibodi yang mengenai virus HE sebagai antigennya. Vaksin ini dikenal dengan istilah *Anti – idiotypes*. Pada berbagai percobaan, antibodi (imunogen) ini mampu menginduksi respon kekebalan terhadap antigen asli pada mencit dan *hamster*. Simpanse yang diimunisasi dengan antibodi ini, dapat terlindung dan serangan virus HB.

Gencarnya para ahli mencari vaksin alternatif untuk menggan-

tikan vaksin yang sudah ada bukan berarti vaksin yang ada ini kurang layak digunakan, tetapi untuk mencari vaksin yang paling baik dipandang dari berbagai segi.

#### KEPUSTAKAAN

1. Hollinger FB. Hepatitis B Virus. Dalam: Virology 2nd ed. New York: Raven Press Ltd. 1990.2171–2236.
2. Jin OC. Experiences of Clinical Trials d New Biological Products e.g. Hepatitis B Vaccine in Singapore. World Biotech Rep. W85; 93 : 119 – 28.
3. Kitano K. et al. Recombinant Hepatitis B Virus Surface Antigen P31 Accumulates as particlesin Saccharomyces cerevisiae. Biotechnology 1987 (5) : 281–2.
4. Michel ML et al. Expression of amplified Hepatitis B Virus Surface Antigen genes in Chinese Hamster Ovary Cells. Biotechnology 1985 (3) : 561– 6.
5. Patzer El. et al. Cell culture derived recombinant HBs Ag is highly immunogenic and protects chimpanzees from infection with Hepatitis B Virus. Biotechnol 1986 (4) : 630 – 6.
6. Valenzuela Pet al. Synthesis and Assembly in Yeast of Hepatitis B Surface Antigen particles containingthe Polyalbumin Receptor. Biotechnol 1985 (3): 317 – 20.
7. Valenzuela P. et aL Antigen Engineering in Yeast : Synthesis and assembly of hybrid Hepatitis B Surface Antigen – Herpes Simplex 1 GD particles. Biotechnol 1985 (3) : 323 – 32.
8. Zuekennan AJ. New Hepatitis B Vaccines. BMJ 1985; 290 : 492 – 6.
9. Zuckerman AJ. Novel approaches to Hepatitis B Vaccine development. DN & P. 1988 (1); 1:22 – 6.

