

**PS1**

**50**

Jakarta

**LAPORAN AKHIR**  
**PENGEMBANGAN PROTOTIPE VAKSIN H5N1**  
**DENGAN PENDEKATAN AGENT**



**KETUA PELAKSANA :**

**Dr. dr. Budiman Bela, SpMK**

**Tahun 2012**

**PUSAT BIOMEDIS DAN TEKNOLOGI DASAR KESEHATAN**  
**BADAN LITBANG KESEHATAN**  
**DEPARTEMEN MIKROBIOLOGI FKUI/**  
**PUSAT PENELITIAN DAN LAYANAN KESEHATAN VIROLOGI DAN**  
**KANKER PATOLOGI**  
**FAKULTAS KEDOKTERAN**  
**UNIVERSITAS INDONESIA**  
**2012**

Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan

PERPUSTAKAAN

Tanggal : 18-6-2013

No. Judul : \_\_\_\_\_

No. Kelas : Ps 1

50

**LAPORAN AKHIR**  
**PENGEMBANGAN PROTOTIPE VAKSIN H5N1**  
**DENGAN PENDEKATAN AGENT**



**KETUA PELAKSANA :**  
**Dr. dr. Budiman Bela, SpMK**

**Tahun 2012**

**PUSAT BIOMEDIS DAN TEKNOLOGI DASAR KESEHATAN**  
**BADAN LITBANG KESEHATAN**  
**DEPARTEMEN MIKROBIOLOGI FKUI/**  
**PUSAT PENELITIAN DAN LAYANAN KESEHATAN VIROLOGI DAN**  
**KANKER PATOLOGI**  
**FAKULTAS KEDOKTERAN**  
**UNIVERSITAS INDONESIA**  
**2012**

## I. JUDUL PENELITIAN

### **Pengembangan Prototipe Vaksin H5N1 dengan Pendekatan Agent**

## II. LATAR BELAKANG

Virus Influenza A galur baru penyebab pandemi dapat muncul sewaktu-waktu secara **tidak** terduga karena struktur antigen virus ini dapat berubah melalui proses mutasi genetik **yang** berlangsung cepat dan sering disebut sebagai *antigenic shift* maupun melalui proses **perubahan** secara lambat yang disebut *antigenic drift*. Adanya *reservoir* pada hewan, yaitu **pada** unggas air liar maupun terdomestikasi, yang tidak memperlihatkan gejala jelas atau **tidak** menyebabkan kematian pada saat terinfeksi virus ini mengakibatkan virus ini terus menerus bersirkulasi di alam dan menghasilkan varian-varian virus baru tanpa terdeteksi. Interaksi unggas air secara langsung dengan manusia maupun melalui unggas maupun hewan peliharaan lainnya berpotensi menimbulkan virus influenza A galur baru yang dapat berkembang menjadi virus penyebab pandemi.

Sebagian besar infeksi virus influenza A pada manusia tidak menimbulkan penyakit dengan gejala yang berat, tetapi angka kematian yang terjadi pada pandemi tidak dapat diabaikan, bahkan pada beberapa kejadian pandemi angka kematian yang ditimbulkan sangat tinggi (1). Hal ini menyebabkan Badan Kesehatan Dunia (*World Health Organization/WHO*) menghimbau negara-negara di dunia untuk mengembangkan dan mengimplementasikan rencana persiapan pandemi untuk mitigasi dampak kesehatan dan sosial pandemi (2).

Virus Influenza A merupakan salah satu tipe virus influenza yang terdiri atas virus influenza A, B dan C. Virus influenza A terdiri atas beberapa subtipe yang ditentukan berdasarkan tipe antigen hemagglutinin (H) dan neuraminidase (N), dimana terdapat 16 jenis antigen H dan 9 jenis antigen N (3,4). Subtipe virus Influenza A yang lazim ditemukan bersirkulasi pada manusia saat ini adalah H1N1 dan H3N2 (5). Selain kedua subtipe tersebut, beberapa subtipe virus Influenza A ditemukan pada manusia ternyata berasal dari hewan. Virus Influenza A berasal dari hewan yang melewati "batas lintas spesies" sehingga menginfeksi manusia antara lain disebabkan subtipe H1N1, H7N7, H9N2, H7N3, H5N1 dan H10N7 (1,6). Virus influenza unggas H5N1 (AI H5N1) dipandang berpotensi sebagai agensia penyebab pandemi influenza global sejak virus ini ditemukan melewati "batas lintas spesies" dan ditemukan menginfeksi manusia pada tahun 1997 (1,7,8).

Infeksi influenza A H5N1 pada manusia ditemukan pertama kali pada tahun 2005 dan sampai dengan 6 Mei 2010, jumlah kasus infeksi influenza A H5N1 terkonfirmasi mencapai 165 kasus dengan jumlah kematian sebanyak 136 orang (82,4%) (9,10). Sejak tahun 2007 sampai saat ini jumlah kasus infeksi influenza A H5N1 terlihat menurun (10), namun kemungkinan munculnya virus influenza A H5N1 galur baru penyebab pandemi perlu untuk diwaspadai. Peningkatan migrasi penduduk secara global, posisi geografis Indonesia yang terletak pada jalur migrasi unggas liar, serta fakta bahwa unggas liar merupakan "reservoir" virus influenza A menjadi alasan penting yang menjadi landasan untuk senantiasa memperhitungkan influenza A, khususnya influenza A H5N1 sebagai potensi ancaman bagi kehidupan masyarakat Indonesia.

Kewaspadaan terhadap munculnya virus influenza A H5N1 galur baru akibat fenomena *antigenic drift* maupun *antigenic shift* yang berpotensi sebagai penyebab pandemi perlu untuk dipertahankan mengingat berdasarkan peristiwa pandemi sebelumnya, virus influenza A penyebab pandemi merupakan virus influenza A unggas dengan kemampuan transmisi dari orang ke orang. Penting untuk diperhatikan pula bahwa virus influenza A H5N1 yang semula hanya ditemukan di unggas dan tidak menginfeksi manusia kemudian menunjukkan kemampuan melintasi batas antara spesies sehingga ditemukan di manusia dan kemudian bahkan ditemukan mampu melakukan infeksi dari orang ke orang walaupun masih secara terbatas dalam kelompok tertentu yang mungkin hampir seluruhnya memiliki hubungan kekeluargaan.

Salah satu upaya persiapan pandemi Influenza A yang direkomendasikan oleh WHO pada tahun 2005 ialah pengembangan vaksin yang efektif, khususnya yang memiliki spektrum proteksi yang luas (11). Vaksinasi merupakan strategi intervensi yang bersifat "cost-effective" karena respon imun terhadap vaksin influenza A bersifat protektif sehingga mampu mencegah terjadinya infeksi yang berpotensi menyerap pendanaan dalam jumlah besar untuk biaya diagnosis, perawatan dan pengobatan. Strategi vaksinasi merupakan salah satu strategi yang dapat diharapkan mencegah angka morbiditas dan mortalitas tinggi pada saat munculnya galur virus influenza A baru dengan struktur antigen yang belum dikenali oleh imunitas populasi manusia, namun terdapat permasalahan yang perlu untuk dipecahkan agar strategi ini dapat diterapkan secara berhasil. Walaupun vaksinasi Influenza A merupakan strategi pengendalian infeksi yang dapat dianggap murah dan efektif, pengembangan vaksin Influenza A berdasarkan teknologi yang dipakai saat ini yaitu menggunakan telur ayam berembrio memiliki kendala tersendiri. Kendala utama dalam

produksi vaksin Influenza A pada telur ayam berembrio ialah pada potensi teknologi ini menghasilkan jumlah vaksin yang mencukupi dalam waktu yang relatif cepat, dimana hal ini sangat penting agar pemberian vaksin dapat dilakukan sebelum terjadinya infeksi pada sebagian besar populasi penduduk suatu negara (12,13). Di sisi lain, vaksinasi seluruh populasi negara bukanlah hal yang mudah untuk dilakukan, karena tidak hanya memerlukan ketersediaan vaksin spesifik yang mampu memberikan perlindungan terhadap galur virus baru, tetapi juga memiliki tantangan tersendiri dalam distribusi vaksin, khususnya di wilayah Indonesia yang sulit untuk dijangkau dalam waktu cepat.

Vaksin DNA menarik untuk dikembangkan dalam rangka persiapan menghadapi pandemi influenza A. Waktu yang dibutuhkan untuk melakukan konstruksi "bibit vaksin" serta memperoleh vaksin dalam skala besar yang mencukupi untuk vaksinasi seluruh populasi penduduk suatu negara dengan jumlah populasi yang besar seperti Indonesia dapat dilakukan dalam kurun waktu 11 minggu, sehingga vaksinasi seluruh populasi secara teoritis dapat dilakukan dalam kurun waktu kurang dari 16 minggu sejak susunan nukleotida virus penyebab pandemi diperoleh. Sifat DNA yang relatif jauh lebih stabil dibandingkan protein memungkinkan vaksin DNA untuk disebarluaskan ke seluruh pelosok negara, khususnya negara kepulauan seperti Indonesia, dengan cara yang lebih mudah karena tidak tergantung kepada sistem pendingin untuk mempertahankan stabilitas dan efektivitas vaksin.

Vaksin DNA telah terbukti dapat menimbulkan proteksi silang antar subtipe influenza A yang berbeda, bila gen yang disisipkan pada vektor vaksin DNA merupakan gen pengeksresi protein bersusunan asam amino terkonservasi pada berbagai subtipe virus influenza A, misalnya gen pengeksresi protein matriks dan nukleoprotein. Ditinjau dari segi keunggulan vaksin DNA dalam menginduksi respon imun seluler, maka dapat diperkirakan bahwa vaksin DNA pengeksresi protein H dan N dari subtipe tertentu berpotensi lebih besar untuk menghasilkan proteksi silang terhadap varian-varian galur tersebut karena respon imun seluler memiliki kemampuan pengenalan epitop yang lebih beragam dibandingkan respon imun humoral (14). Selain itu, tidak tertutup kemungkinan bahwa vaksin DNA berdasarkan suatu subtipe virus influenza A dapat memberikan proteksi terhadap infeksi oleh virus influenza A subtipe lainnya. Kemungkinan ini menjadi terbuka berdasarkan fakta yang ditemukan bahwa infeksi sebelumnya oleh suatu subtipe influenza A dapat memberikan proteksi terhadap infeksi oleh virus influenza A subtipe lain yang terjadi kemudian (15, 16).

Respon imun yang diinduksi oleh vaksin DNA meliputi respon imun sel T CD8, sel T CD4, respon imun humoral dan juga respon imun nonspesifik (*innate immunity*) melalui induksi *Toll like receptor* (TLR). Respon imun humoral berperan dalam netralisasi virus sehingga tidak dapat melakukan penempelan pada reseptor sel targetnya, disamping itu antibodi yang berikatan dengan partikel virus juga mengakibatkan penempelan antibodi pada sel terinfeksi yang mengekspresikan partikel virus sehingga sel-sel NK (*natural killer*) tertarik untuk melepaskan substansi-substansi yang bersifat toksik terhadap sel terinfeksi tersebut. Respon sel T CD8 berperan dalam penghancuran sel-sel terinfeksi yang mengekspresikan epitop virus di dalam molekul MHC kelas I akibat interaksi spesifik antara reseptor sel T dengan antigen virus. Perangsangan sel T CD4 (sel T helper) meningkatkan efektivitas sistem imun spesifik yang ditimbulkan oleh vaksin dalam melakukan eliminasi infeksi virus baik melalui jalur respon imun humoral maupun respon imun seluler.

Vaksin DNA jauh lebih stabil dibandingkan dengan vaksin berbentuk antigen protein serta dapat dengan mudah disediakan dalam bentuk preparat kering tanpa mengurangi stabilitas dan kemampuannya menginduksi respon imun. Hal ini merupakan salah satu keunggulan yang mempermudah distribusi vaksin DNA ke seluruh pelosok Indonesia tanpa kendala ketergantungan pada "rantai dingin" yang memerlukan fasilitas pendingin khusus untuk penyimpanan vaksin. Keunggulan vaksin DNA yang lain ialah pada teknik amplifikasi "seed vaccine" yang relatif lebih murah dan berpotensi untuk dilakukan dengan memanfaatkan bahan-bahan baku yang diproduksi sendiri di Indonesia.

Modifikasi vaksin DNA untuk meningkatkan imunogenitas vaksin telah dilaporkan dalam beberapa penelitian. Penambahan gen Interleukin-2 (IL2) telah diketahui dapat meningkatkan efikasi vaksin DNA (17). Modifikasi lain adalah modifikasi antigen sehingga menjadi antigen yang dapat disekresikan (18). Dalam penelitian ini akan dilakukan modifikasi pada vaksin DNA sehingga antigen virus yang dihasilkan akan membentuk *viral like particle* (VLP). Selain itu akan dilakukan fusi antara gen penyandi antigen virus dengan susunan nukleotida penyandi peptida atau protein yang diharapkan dapat meningkatkan respon antibodi (sel B), respon sel T-CD4 dan respon sel T-CD8. Untuk meningkatkan respon antibodi dilakukan fusi antigen virus dengan komplemen C3d yang diharapkan akan meningkatkan stimulasi sel B yang dipicu oleh interaksi C3d-CD21 sedangkan fusi antigen dengan CD40L dilakukan untuk aktivasi sinyal kedua melalui interaksi CD40-CD40L untuk stimulasi lanjut pada sel B. Komponen lain yang juga menarik untuk disertakan ialah komponen interaksi CD28-B7. Fusi antigen dengan komponen C3b diharapkan akan

meningkatkan fagositosis antigen oleh makrofag yang akan berubah menjadi "Antigen Presenting Cells" untuk stimulasi sel T-CD4 spesifik. Stimulasi sel T-CD8 oleh vaksin DNA dapat dikatakan merupakan sifat alamiah vaksin DNA, karena antigen yang dihasilkan oleh vaksin DNA diproduksi oleh sel resipien vaksin sehingga bersifat antigen endogen yang terdapat dalam sitosol.

Vaksin jenis lainnya yang juga menarik untuk dikembangkan adalah vaksin subunit rekombinan, khususnya yang diekspresikan pada sistem ekspresi prokariota, misalnya *Escherichia coli*. Vaksin rekombinan yang diekspresikan pada *E.coli* memiliki keunggulan dari segi biaya produksi karena medium yang digunakan relatif jauh lebih murah dibandingkan medium kultur sel, selain itu tingkat produksi antigen rekombinan juga relatif tinggi. Sistem purifikasi antigen rekombinan juga telah dikembangkan sehingga memungkinkan produksi dalam jumlah besar. Untuk mengatasi permasalahan kesulitan antigen eksogen menstimulasi respon sel T-CD8, akan dilakukan fusi antara protein rekombinan dengan protein listeriolysin dan susunan asam amino yang mampu meningkatkan ubiquitinasi. Protein listeriolysin diharapkan akan meningkatkan lokalisasi protein yang difagositosis oleh makrofag ke dalam sitosol sedangkan susunan asam amino yang meningkatkan ubiquitinasi diharapkan akan meningkatkan proteolisis antigen di proteasom sehingga epitop antigen eksogen yang diinjeksikan pada resipien vaksin akan terekspresi pada molekul MHC kelas I untuk stimulasi sel T-CD8 spesifik. Alternatif lain yang dapat dilakukan ialah melakukan fusi dengan protein voyager virus herpes simpleks meningkatkan meningkatkan penetrasi antigen ke dalam sel non fagosit.

Telah diketahui bahwa stimulasi respon antibodi oleh antigen berstruktur repetitif lebih kuat dibandingkan stimulasi oleh antigen berepitop tunggal. Interaksi epitop repetitif pada antigen berstruktur repetitif dengan reseptor spesifik pada sel B (antibodi pada permukaan sel B) akan mengakibatkan sambung silang (*cross-linking*) reseptor spesifik pada permukaan sel B dan menimbulkan stimulasi kuat pada sel B. Partikel virus pada dasarnya merupakan komponen repetitif yang terbentuk oleh perakitan mandiri (*self-assembly*) komponen protein pembentuk partikel virus, sehingga secara alamiah partikel virus merupakan stimulator kuat respon sel B karena interaksi reseptor spesifik pada sel B dengan epitop repetitif pada permukaan partikel virus memungkinkan terjadinya fenomena sambung silang pada permukaan sel B.

Pembentukan partikel virus tanpa kandungan materi genetik dapat terjadi secara alamiah maupun secara artifisial. Struktur partikel virus tanpa kandungan materi genetik disebut juga sebagai *Viral Like Particle* (VLP). Imunisasi binatang percobaan dengan VLP influenza A telah terbukti dapat menghasilkan respon imun protektif pada ujiantang binatang yang telah diimunisasi dengan partikel virus influenza A infeksius homologus (19). Pembentukan VLP influenza A telah dicoba pada sistem ekspresi mamalia (sel mamalia) dan sistem ekspresi baculovirus (sel serangga) (19,20).

Penelitian ini secara umum bertujuan untuk menghasilkan berbagai prototipe vaksin vaksin influenza A serta melakukan penilaian efektivitas vaksin maupun aspek ekonomi berbagai prototipe vaksin tersebut. Vaksin yang dikembangkan berupa vaksin DNA, vaksin VLP dan vaksin protein subunit rekombinan. Setiap jenis prototipe vaksin influenza A yang dikembangkan dalam penelitian ini akan diteliti potensinya sebagai kandidat vaksin persiapan pandemi melalui uji respon imun humoral, uji respon imun selular dan ujiantang terhadap berbagai jenis galur virus influenza A H5N1 yang berkembang di Indonesia, maupun terhadap virus influenza A subtipe lainnya.

Institusi pelaksana penelitian, telah berpengalaman dalam pengembangan prototipe vaksin DNA, maupun prototipe vaksin protein subunit rekombinan. Berbeda dengan prototipe vaksin DNA influenza A H5N1 yang akan dikembangkan dalam penelitian ini, prototipe vaksin influenza A H5N1 yang dikembangkan sebelumnya di institusi pelaksana penelitian tidak difusikan dengan susunan nukleotida yang bersifat ajuvan.

## PERMASALAHAN

Galur virus influenza A H5N1 penyebab pandemi sulit untuk diprediksi karakteristik antigeniknya karena informasi yang dimiliki mengenai pola replikasi virus serta faktor-faktor molekular yang mendasari tahapan infeksi virus pada berbagai spesies belum mencukupi untuk dipakai dalam penentuan arah evolusi virus influenza A H5N1 yang berpotensi sebagai virus influenza A penyebab pandemi. Walaupun demikian, dapat diperkirakan bahwa struktur antigen yang dimiliki oleh virus influenza A H5N1 galur baru akan memiliki persamaan epitop dengan virus influenza A yang beredar saat ini sehingga respon imun yang diinduksi oleh antigen virus influenza A H5N1 berbasis susunan asam amino galur tahun ini berpotensi memiliki daya proteksi silang dengan galur baru virus influenza A H5N1 yang

timbul di kemudian hari sebagai penyebab pandemi. Potensi persamaan epitop ini khususnya lebih tinggi pada epitop yang dikenali oleh sel T, baik sel T CD4 maupun sel T CD8.

Untuk menghadapi kemungkinan timbulnya virus influenza A non H5N1 sebagai penyebab pandemi influenza A, perlu diteliti potensi protein virus influenza A dengan susunan asam amino terkonservasi pada semua subtipe influenza A untuk dikembangkan sebagai vaksin persiapan pandemi influenza A baru. Protein matriks dan nukleoprotein berpotensi sebagai kandidat vaksin yang memenuhi persyaratan ini. Di sisi lain, perlu dipikirkan penghambatan replikasi virus oleh respon antibodi netralisasi yang sebagian besar bekerja berdasarkan interaksi dengan protein permukaan Hemaglutinin. Untuk ini dapat dipertimbangkan perancangan susunan asam nukleat penyandi antigen Hemaglutinin beberapa subtipe influenza A yang berpotensi penyebab pandemi, dengan susunan asam amino konsensus pada setiap subtipe tersebut. Antigen permukaan yang mungkin dapat dianggap mendesak untuk dikembangkan ialah antigen hemaglutinin H5, H9, dan H1 (2009), neuraminidasa N1 dan N2.

Keunggulan vaksin DNA dalam menginduksi respon sel T-CD8 spesifik secara efisien pada pemberian vaksin untuk "priming" dapat berpotensi merugikan dalam pemakaian vaksin DNA sebagai "booster". Respon sel T-CD8 yang dihasilkan melalui vaksinasi sebelumnya dapat mengakibatkan destruksi sel yang mengekspresikan antigen vaksin DNA, sehingga stimulasi respon imun oleh vaksinasi booster kurang efektif akibat penurunan jumlah dan masa pemaparan antigen dengan sistem imun. Untuk mengatasi permasalahan ini diperlukan vaksinasi menggunakan antigen eksogen yang tidak hanya mampu menginduksi respon antibodi dan respon sel T-CD4 secara efisien, tetapi juga mampu menginduksi respon sel T-CD8 yang diperlukan untuk eliminasi sel terinfeksi virus.

Antigen eksogen yang dipakai untuk imunisasi booster pasca imunisasi awal dengan vaksin DNA dapat berupa virus hidup dilemahkan, partikel virus terinaktivasi, Viral Like Particle maupun protein subunit. Jenis antigen yang paling mudah dan relatif paling murah untuk dikembangkan ialah vaksin protein subunit, khususnya yang diekspresikan pada sistem ekspresi prokariota. Telah diketahui bahwa protein hemaglutinin virus influenza A dapat diekspresikan secara efisien pada sistem ekspresi prokariota dengan melakukan optimasi pada susunan kodon serta menggunakan galur sel *Escherichia coli* (*E. coli*) tertentu yang dapat mengatasi permasalahan toksisitas protein rekombinan sel *E. coli*. Produksi protein rekombinan menggunakan sistem ekspresi *E. coli* relatif jauh lebih murah dibandingkan

produksi antigen virus menggunakan kultur sel mamalia ataupun menggunakan telur ayam berembrio. Antigen eksogen lainnya yang dapat dipakai untuk imunisasi booster ialah antigen eksogen berbentuk VLP. Antigen jenis ini dapat menginduksi respon sel B yang kuat karena mampu melakukan *cross-linking* reseptor sel B spesifik oleh epitop repetitif pada permukaan VLP. Antigen VLP dapat diproduksi pada sistem ekspresi mamalia, sistem ekspresi *baculovirus*, dan sistem ekspresi tumbuh-tumbuhan.

Proses produksi maupun antigen yang dihasilkan dari tumbuh-tumbuhan, sistem ekspresi prokariota tidak mengandung komponen binatang, seperti halnya antigen virus yang diproduksi menggunakan kultur sel MDCK (berasal dari anjing), sehingga permasalahan yang terkait produk binatang seperti kandungan patogen hewani dan permasalahan halal maupun haram dapat dihindarkan. Vaksin protein subunit rekombinan berpotensi untuk digunakan dalam vaksinasi "booster" pasca imunisasi dengan vaksin DNA. Pemberian vaksin ini dengan jalur administrasi ataupun pencampuran dengan ajuvan yang sesuai juga dapat diarahkan untuk merangsang respon IgA spesifik maupun respon sel T-CD8.

Beberapa pertanyaan yang perlu dijawab dalam pengembangan vaksin influenza A berbasis DNA, antigen rekombinan prokariota dan VLP ialah:

1. Bagaimana pengaruh fusi antigen vaksin influenza A dengan masing-masing komponen C3d, CD40L, CD28, listeriolysin, Vif HIV-1 dan protein voyager Herpes Simpleks terhadap respon imun humoral dan selular?
2. Apakah vaksinasi dengan antigen NI konsensus dapat menimbulkan respon sel T sitotoksik terhadap sel pengekspresi antigen neuraminidasa H1N1 dan H5N1?
3. Bagaimana respon antibodi netralisasi yang ditimbulkan oleh imunisasi antigen H5 dan H1 bersusunan asam amino konsensus terhadap infeksi beberapa galur H5 dan H1?
4. Bagaimana kombinasi pemberian vaksin untuk "priming" dan "booster" yang dapat secara efisien merangsang respon imun humoral, sel T CD4 dan sel T CD8?
5. Apakah respon protektif terhadap infeksi virus influenza A H1N1 dan H5N1 bervirulensi tinggi dapat pasca "priming" menggunakan vaksin DNA influenza A?
6. Apakah respon protektif terhadap infeksi virus influenza A H1N1 dan H5N1 dapat diperoleh dalam tempo kurang dari 1 minggu pasca vaksinasi menggunakan kombinasi vaksin yang akan diteliti?
7. Apakah respon protektif masih dapat diinduksi oleh vaksinasi pada individu yang berada pada fase dini infeksi influenza A?

### **III. MANFAAT PENELITIAN**

1. Informasi yang diperoleh dari penelitian ini dapat dimanfaatkan oleh peneliti lain untuk pengembangan vaksin influenza A berdaya proteksi tinggi maupun vaksin virus berenvelop lainnya

2. Prototipe vaksin yang dikembangkan dalam penelitian ini berpotensi untuk dipatenkan sebagai “seed vaccine” nasional yang merupakan hak milik bangsa Indonesia
3. Jenis vaksin yang dikembangkan dalam penelitian ini dapat digunakan sebagai model untuk penelitian respon imun humoral, respon imun sel T CD4 maupun sel T CD8 terhadap berbagai jenis antigen lainnya
4. Berbagai jenis “platform” prototipe vaksin yang dikembangkan dalam penelitian ini akan memberikan alternatif yang lebih luas untuk mendapatkan prototipe vaksin influenza A yang efektif, aman dan stabil, serta dapat diproduksi secara cepat dan mudah dengan biaya produksi yang relatif lebih ekonomis.
5. Informasi yang diperoleh melalui eksperimen imunisasi dengan berbagai komposisi vaksin pada vaksinasi “priming” dan “booster” bermanfaat untuk menentukan komposisi vaksin pada “priming” dan “booster” yang mampu merangsang respon imun secara lebih dini dan efisien
6. Pengalaman yang diperoleh dari penelitian ini meningkatkan kemampuan peneliti untuk merancang strategi pengembangan vaksin
7. Pengalaman yang diperoleh dalam melakukan pengembangan vaksin DNA dan vaksin rekombinan yang diproduksi dalam berbagai sistem ekspresi dapat dibagikan kepada kelompok penelitian Indonesia lainnya untuk meningkatkan kemandirian bangsa Indonesia dalam teknologi pengembangan vaksin
8. Keterlibatan peneliti-peneliti muda dalam penelitian ini akan menghasilkan generasi peneliti baru yang memiliki wawasan luas serta keterampilan menyusun strategi penelitian dan keterampilan teknis yang lebih tinggi dalam pengembangan dan penelitian vaksin

#### IV. TUJUAN PENELITIAN

##### Tujuan Umum:

Tujuan umum penelitian ini adalah untuk mendapatkan beberapa kandidat vaksin influenza A H5N1 dalam bentuk vaksin DNA, antigen rekombinan prokariota dan antigen VLP dalam bentuk protein fusi maupun non fusi dengan komponen C3d, CD40L, CD28 dan listeriolisins *Listeria monocytogenes* serta mendapatkan informasi mengenai respon imun humoral dan selular yang ditimbulkan oleh kombinasi vaksin yang diberikan sebagai “priming” dan “booster” sebagai landasan untuk menetapkan

komposisi serta cara pemberian vaksin yang memberikan respon imun protektif yang lebih dini dan lebih efisien.

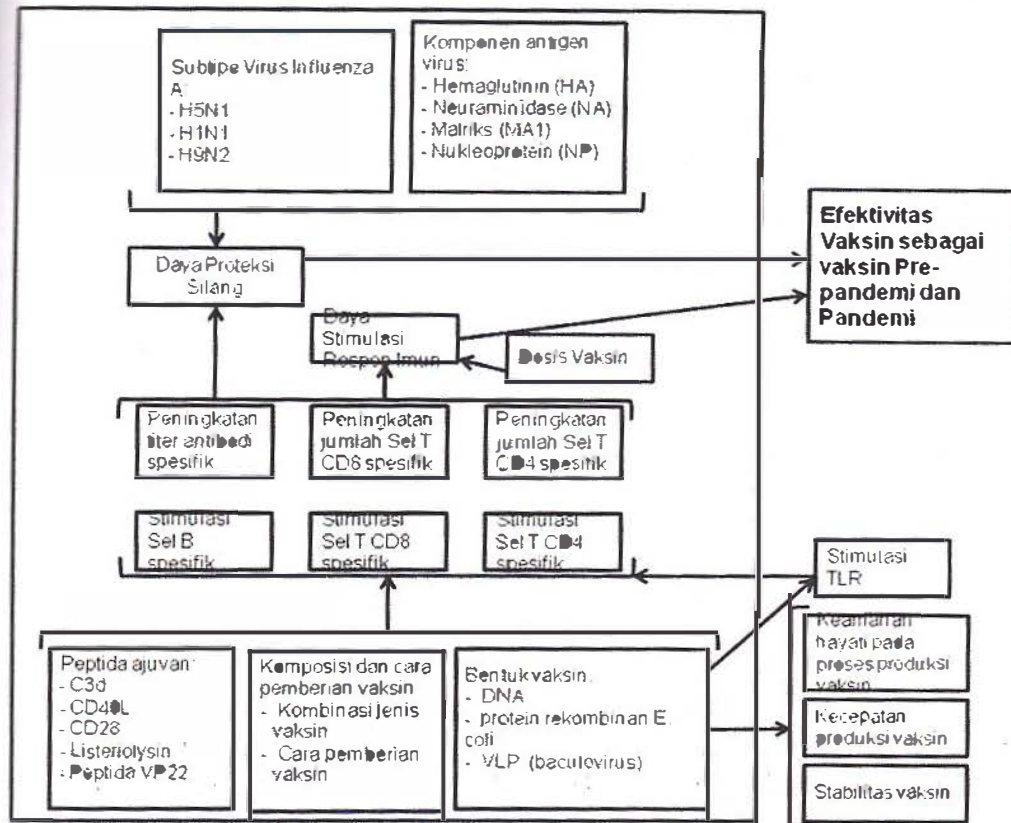
### **Tujuan Khusus**

Tujuan khusus penelitian ini ialah:

1. Mendapatkan konstruksi vektor vaksin DNA fusi dan non-fusi pengekspresi antigen H5, NI, MA dan NP.
2. Mendapatkan kandidat vaksin VLP mengandung komponen HA+NA+MA (dengan atau tanpa NP) untuk influenza A subtipe H5N1
3. Mendapatkan kandidat vaksin influenza A H5, H1, MA dan NP berupa protein rekombinan prokariota
4. Mendapatkan informasi mengenai pengaruh penambahan C3d, CD40L dan CD28 pada antigen prokariota terhadap respon sel T CD4 dan respon antibodi
5. Mendapatkan informasi mengenai pengaruh fusi antigen influenza A dengan listeriolisin, Vif HIV-1 dan protein Vp22 Herpes Simpleks terhadap pembentukan respon sel T CD8 spesifik epitop antigen virus influenza
6. Mendapatkan informasi mengenai potensi vaksin DNA influenza A untuk menimbulkan respon imun protektif pasca pemberian vaksin untuk "priming"
7. Mendapatkan komposisi vaksin "priming" dan "booster" yang dapat menimbulkan respon protektif lebih dini secara lebih efisien
8. Mendapatkan informasi mengenai pemakaian vaksin influenza A untuk mendapatkan efek kuratif pada individu (hewan coba) yang telah terinfeksi
9. Mendapatkan informasi mengenai jangka waktu timbulnya respon protektif pada komposisi vaksin yang dinilai memiliki respon imun seluler dan humoral yang terbaik serta memiliki potensi paling tinggi pada ujiantang hewan coba dengan infeksi virus influenza A H5N1 atau H1N1

**V. METODE PENELITIAN**

**VI. Kerangka Konsep Penelitian**



Variabel yang berada di luar kotak tidak termasuk dalam variabel yang akan diteliti dalam penelitian yang diusulkan

## V.2. Tempat Penelitian

- Laboratorium dengan fasilitas Biologi Molekular, Rekayasa DNA dan Rekayasa Protein
- Laboratorium dengan fasilitas BSL-2 dan BSL-3
- laboratorium dengan fasilitas BSL-3 hewan

## V.3. Waktu Penelitian

Lama Penelitian: 3 tahun  
2012 - 2014

## V.4. Jenis Penelitian

Penelitian intervensi

## V.5. Disain Penelitian

Disain penelitian ini ialah eksperimen

## V.6. Populasi dan Sampel

Populasi penelitian ialah hewan coba berupa mencit (*Mus musculus*) galur Balb/c atau ddY. Akan dilakukan beberapa eksperimen menggunakan hewan coba untuk menilai pengaruh fusi peptida ajuvan, dosis dan kombinasi pemakaian prototipe vaksin dalam vaksinasi "priming" dan "booster", maupun pengaruh pencampuran prototipe vaksin dalam satu sediaan terhadap respon imun spesifik (antibodi, sel T CD4, sel T CD8), daya proteksi silang, proteksi dini dan efek kuratif vaksinasi.

Perhitungan sampel dilakukan berdasarkan rumus Federer:

$(t-1)(n-1) \geq 15$ , dimana

t = jumlah kelompok perlakuan

n = jumlah individu dalam setiap kelompok perlakuan

## V.3. Variabel

### Tahun 1

#### Prediksi Struktur Sekunder dan Tersier Protein Fusi

*Variabel independen:*

Susunan Asam Amino H5, N1, MA1, NP, C3d, CD40L, CD28, cell penetrating peptide (CPP) Listeriolysin dan VP22, situs insersi peptida ajuvan pada susunan asam amino protein virus, posisi relatif dan susunan peptida protein virus (pada Scrambled Antigen Vaccine)

*Variabel terkendali:*

Piranti lunak untuk prediksi struktur sekunder serta piranti lunak untuk prediksi struktur tersier protein

*Variabel dependen:*

Eksposisi peptida ajuvan pada permukaan molekul protein virus, prediksi struktur sekunder peptida ajuvan, prediksi struktur tersier peptida ajuvan

#### Konstruksi dan ekspresi Vaksin DNA

*Variabel independen:*

Susunan nukleotida H5, N1, MA1, NP, C3d, CD40L, CD28, cell penetrating peptide (CPP) Listeriolysin dan VP22

*Variabel terkendali:*

Vektor ekspresi sistem mamalia, situs insersi pada vektor ekspresi, galur *Escherichia coli* (*E. coli*) untuk propagasi plasmid, kondisi kultur *E. coli*, metoda purifikasi plasmid, metoda sekuensing, kondisi kultur sel mamalia, metoda transfeksi, metoda deteksi ekspresi antigen

*Variabel dependen:*

Susunan nukleotida vaksin DNA, ekspresi antigen virus pada sel mamalia

#### Konstruksi vektor dan ekspresi antigen rekombinan virus pada sistem ekspresi prokariota

*Variabel independen:*

Susunan nukleotida H5, N1, MA1, NP, C3d, CD40L, CD28, cell penetrating peptide (CPP) Listeriolysin dan VP22

*Variabel terkontrol:*

Vektor ekspresi sistem mamalia, situs insersi pada vektor ekspresi, galur *Escherichia coli* (*E. coli*) untuk propagasi plasmid, kondisi kultur *E. coli*, metoda purifikasi plasmid, metoda sekuensing, galur *Escherichia coli* (*E. coli*) untuk ekspresi protein rekombinan, kondisi kultur *E. coli*, metoda deteksi ekspresi antigen

*Variabel dependen:*

Susunan nukleotida antigen virus, ekspresi antigen virus pada kultur sel SF9

**Konstruksi vektor dan ekspresi VLP pada sistem ekspresi baculovirus**

*Variabel independen:*

Susunan nukleotida H5, N1, MA1, NP, C3d, CD40L, CD28, cell penetrating peptide (CPP) Listeriolysin dan VP22

*Variabel terkontrol:*

Vektor ekspresi sistem mamalia, situs insersi pada vektor ekspresi, galur *Escherichia coli* (*E. coli*) untuk propagasi plasmid, kondisi kultur *E. coli*, metoda purifikasi plasmid, metoda sekuensing, Jenis sel serangga (SF9) kondisi kultur sel SF9, metoda transfeksi, metoda deteksi ekspresi antigen

*Variabel dependen:*

Susunan nukleotida antigen virus, ekspresi antigen virus pada kultur sel SF9

**Analisis respon antibodi, sel T CD4 dan sel T CD8 mencit diimunisasi Vaksin DNA**

*Variabel independen:*

Vaksinasi dengan vaksin DNA mengandung gen H5, N1, MA1 dan NP, dengan dan tanpa fusi C3d, CD40L, CD28; cell penetrating peptide (CPP) Listeriolysin dan VP22, vaksinasi dengan antigen non fusi

*Variabel terkontrol:*

dosis vaksin, volume injeksi vaksin, species dan galur hewan coba (mencit galur Balb/c atau ddY), jenis kelamin hewan coba (betina), usia hewan coba (6-8 minggu), tenggang waktu antara vaksinasi awal, booster dan pengambilan sampel (darah dan splenosit)

*Variabel dependen:*

Titer antibodi hemaglutinin; titer antibodi neuraminidase; titer antibodi matriks; titer IL-2, titer interferon gamma, jumlah sel T-CD4 produsen sitokin per  $10^6$  splenosit pasca paparan dengan antigen dalam kondisi kultur sel; jumlah sel T-CD8 produsen sitokin per  $10^6$  splenosit pasca paparan dengan sel pengeksresi

**Tahun 2**

**Analisis respon antibodi, sel T CD4 dan sel T CD8 mencit diimunisasi Vaksin VLP dan protein rekombinan**

*Variabel independen:*

Dosis vaksinasi dengan antigen VLP baculovirus (H5N1, H1N1, H9N2); vaksinasi dengan antigen rekombinan prokariota H5, H1, H9, N1 dan N1 dengan dan tanpa fusi

dengan C3d, CD40L, CD28, Listeriolysin dan VP22; komposisi vaksin "priming" dan "booster"; dosis imunisasi priming vaksin DNA (pada uji coba analisis respon imun protektif vaksin DNA)

**Variabel terkontrol:**

dosis vaksin antigen rekombinan prokariota, volume injeksi vaksin, usia hewan coba (6-8 minggu), galur hewan coba (mencit galur Balb/c atau ddY), jenis kelamin hewan coba (betina), tenggang waktu antara vaksinasi awal, booster dan pengambilan sampel (darah dan splenosit); tenggang waktu antara "priming" vaksin DNA dan pencabaran dengan virus influenza A

**Variabel dependen:**

Titer antibodi hemaglutinin; titer antibodi neuraminidase; titer antibodi matriks; jumlah sel T-CD4 produsen sitokin per  $10^6$  splenosit pasca paparan dengan antigen dalam kondisi kultur sel; jumlah sel T-CD8 produsen sitokin per  $10^6$  splenosit; respon protektif (terhadap variabel independen dosis vaksin DNA pada imunisasi "priming") dan waktu timbulnya respon protektif

### Tahun 3

**Variabel independen:**

Komposisi vaksin dengan respon imun seluler dan humoral terbaik berdasarkan hasil penelitian tahun 1 dan 2, dosis vaksinasi "priming" dan "booster"; jenis antigen (HA, NA, MAI atau NP)

**Variabel terkontrol:**

dosis vaksin, volume injeksi vaksin, usia hewan coba (6-8 minggu), galur hewan coba ((mencit galur Balb/c atau ddY), jenis kelamin hewan coba (betina), tenggang waktu antara vaksinasi awal, booster dan pengambilan sampel (darah dan splenosit), tenggang waktu antara "priming" komposisi vaksin terbaik dan pencabaran dengan virus influenza A

**Variabel dependen:**

Efek kuratif; waktu timbulnya respon protektif; Efek proteksi silang; titer antibodi hemaglutinin; titer antibodi neuraminidase; titer antibodi matriks; jumlah sel T-CD4 produsen sitokin per  $10^6$  splenosit pasca paparan dengan antigen dalam kondisi kultur sel; jumlah sel T-CD8 produsen sitokin per  $10^6$  splenosit; perubahan berat badan, perubahan konsumsi makanan, hitung sel darah tepi, rasio albumin/globulin, berat organ, abnormalitas histopatologi (otak, ginjal, hati, lokasi vaksinasi)

### V.8. Bahan dan cara Kerja

#### Tahun 1:

**Reagen:** susunan asam amino konsensus HA, NA, M1, NP

~~Susunan~~ asam amino protein virus influenza A yang akan dianalisis untuk perancangan susunan asam amino antigen vaksin diunduh dari situs "influenza A resources" NCBI, Genbank. Karena susunan asam amino hemagglutinin (HA), neuraminidase (NA), matriks (M1) dan nukleoprotein (NP) H1N1 telah diperoleh dari penelitian sebelumnya, maka susunan asam amino yang akan dianalisis untuk perancangan vaksin adalah susunan asam HA, NA, M1 dan NP virus influenza A subtype H5N1. Analisis sekuen konsensus masing-masing susunan asam amino dilakukan menggunakan perangkat lunak Bioedit 7.0. dengan terlebih dahulu melakukan penyejajaran sekuen (*alignment*). Sekuen konsensus yang dihasilkan akan dianalisis posisinya terhadap susunan asam amino berbagai virus yang digunakan dengan menggunakan perangkat lunak MEGA 4.1. Posisi sekuen konsensus diharapkan berada tepat di pertengahan pada kladogram yang diperoleh.

*Perancangan susunan asam amino protein HA, NA, M1, NP mengandung peptida ajuvan C3d, CD28, CD40L, CPP Listeriolisin, CPP VP22*

~~Susunan~~ asam amino peptida ajuvan C3d, CD28, CD40L, CPP Listeriolisin dan CPP VP22 ~~di susun~~ dengan susunan asam amino yang berdasarkan publikasi dapat melakukan fungsi ~~tersebut~~ dengan ligannya (C3d, CD28, CD40L) atau fungsi "cell penetrating peptide" (Listeriolisin dan VP22) dan diposisikan sedemikian rupa terhadap susunan asam amino protein virus (HA, NA, M1 dan NP) agar susunan asam amino peptida ajuvan dapat terekspos. Pemilihan posisi peletakan peptida ajuvan dilakukan berdasarkan hasil analisis ~~struktur~~ struktur sekunder menggunakan piranti lunak online pada situs "predictprotein.org" dengan memilih posisi peletakan yang menghasilkan struktur sekunder peptida ajuvan yang sesuai dengan struktur aslinya. Selain itu pemilihan posisi peletakan juga dilakukan berdasarkan prediksi struktur tersier menggunakan piranti lunak online EsyPred3D dan visualisasi dengan piranti lunak RasMol 2.7.5 dengan memilih posisi peletakan yang menghasilkan struktur tersier protein virus dengan peptida ajuvan terekspos di permukaan ~~protein~~ protein fusi. Perancangan posisi peletakan susunan asam amino peptida ajuvan juga dilakukan dengan mempertahankan susunan peptida yang telah diketahui atau diperkirakan ~~tersebut~~ epitop netralisasi (dikenali oleh antibodi) maupun epitop yang dapat berinteraksi dengan MHC kelas I atau MHC kelas II (prediksi interaksi dilakukan dengan menggunakan piranti lunak pada situs online).

*Sintesis DNA penyandi susunan asam amino konsensus HA, NA, M1, NP, C3d, CD28, CD40L, CPP Listeriolisin, CPP VP22*

Fragmen-fragmen DNA gen-gen penyandi protein HA, NA, M1 dan NP akan dipesan pada perusahaan yang mampu melakukan sintesis fragmen DNA berdasarkan informasi susunan nukleotida yang telah dioptimasi untuk ekspresi pada sistem ekspresi mamalia dan *Escherichia coli*. Gen ajuvan CD40L, C3d dan CD28 diperoleh dengan memesan pada perusahaan penyedia jasa sintesis nukleotida atau dengan cara amplifikasi materi genetik dengan PCR. Penyisipan gen ditengah *open reading frame* gen penyandi protein virus dilakukan dengan teknik *Overlap Extention PCR*.

#### *Overlap extention PCR*

Sintesis DNA dengan teknik *Overlap extention PCR* dilakukan dengan terlebih dahulu melakukan sintesis DNA serat ganda yang akan berfungsi sebagai DNA pola cetak dalam perpanjangan serat ganda tersebut. Mula-mula digunakan sepasang oligonukleotida dengan bagian 3' yang saling komplementer satu terhadap yang lain. Pada polimerasa berantai, kedua oligonukleotida tersebut akan membentuk DNA serat ganda yang selanjutnya akan digunakan sebagai DNA pola cetak dalam reaksi polimerasa berantai berikutnya dimana selanjutnya akan digunakan pasangan oligonukleotida dengan bagian 3' yang berlekatan dengan daerah target pada ujung 3' DNA serat ganda yang komplementer dengan oligonukleotida mengandung tambahan susunan nukleotida pada ujung 5' yang berfungsi untuk perpanjang DNA serat ganda. Langkah ini diulang dengan pasangan-pasangan oligonukleotida berikutnya sehingga diperoleh DNA serat ganda lengkap mengandung gen dengan susunan sesuai dengan susunan nukleotida penyandi sekuen asam amino konsensus.

#### *Pengklonaan ke dalam plasmid ekspresi sistem mamalia*

DNA serat ganda yang diperoleh secara sintetik diklona ke dalam vektor pengeksresi sistem mamalia di bawah kendali promotor CMV atau SV40. Akan dilakukan pengklonaan ke dalam vektor ekspresi mamalia yang tersedia secara komersial, melalui proses ligasi, ligasi dan skrining *E.coli* transforman dengan analisis restriksi enzimatik.

#### *Konfirmasi DNA pengeksresi protein virus dengan sekuensing*

Untuk memastikan kebenaran susunan nukleotida DNA pengeksresi protein virus yang terklona dalam plasmid ekspresi sistem mamalia, dilakukan analisis sekuensing menggunakan reagensis dye terminator dan analisis sekuen dengan piranti lunak sescap.

#### *Transfeksi ke dalam sel mamalia*

Sebelum sistem penembak DNA diperoleh, prototipe vaksin DNA akan diekspresikan terlebih dahulu dalam sel fibroblas mamalia (galur sel Hela, MDCK atau 293) menggunakan

metoda lipofeksi. Bila alat penembak sudah dikonstruksi, akan dilakukan transfeksi menggunakan alat penembak yang dirancang melalui penelitian ini.

#### *Analisis ekspresi protein*

Analisis ekspresi protein pada sel transfektan akan dilakukan dengan menggunakan metoda imunofluoresens, western blot dan mikroskopi elektron.

#### *Imunisasi mencit BALB/c*

Mencit BALB/c (*Mus musculus* strain BALB/c atau ddY) berusia 6 sampai 8 minggu digunakan sebagai hewan coba untuk menilai respon imun humoral dan selular terhadap beberapa formulasi vaksin DNA yang diprediksi membentuk struktur vaksin subunit dan viral like particle (VLP) bila diekspresikan dalam sel mamalia. Sejumlah 100 ug DNA (vaksin DNA) diinjeksikan secara intramuskuler ke dalam paha kanan mencit. Untuk menghindari rasa tidak nyaman yang mungkin ditimbulkan pada injeksi vaksin hewan coba terlebih dahulu dianestesi. Pemeliharaan binatang dilakukan dalam fasilitas kamar binatang dengan suhu udara dan kelembapan diatur oleh penyejuk ruangan selama 24 jam disertai sistem aliran udara untuk pengeluaran ke luar kamar hewan dan pemasokan udara segar ke dalam kamar hewan. Jumlah binatang percobaan yang akan digunakan dihitung menggunakan rumus Federer  $(t-1)(n-1) \geq 15$  untuk mendapatkan tingkat kepercayaan yang baik pada analisis statistik. Serum mencit dikumpulkan sebelum imunisasi, 3 hari setelah imunisasi pertama (*priming*), 1 minggu setelah imunisasi dan setiap minggu selama 8 minggu. Pada minggu ke dua dan minggu ke tiga pasca *priming* dilakukan injeksi vaksin DNA sejumlah 100 ug pada setiap kali pemberian sebagai *booster*, dimana sampel darah terlebih dahulu diambil sebelum injeksi *booster* dilakukan. Untuk analisis respon imun selular diperlukan pengambilan organ limpa mencit, sehingga setiap kali pengambilan sampel hewan coba akan dikorbankan dengan terlebih dahulu dimatikan dengan teknik dislokasi servikal.

#### *Pengukuran respon antibodi*

Respon antibodi dinilai dengan menggunakan uji ELISA, dengan mengamati nilai absorbans yang diperoleh pada setiap serum. Setiap serum diuji secara duplo untuk mendapatkan nilai rerata absorbans.

#### *Pengukuran respon imun selular*

Pengukuran respon imun selular dilakukan dengan menggunakan uji ELISPOT sel T-CD4 dan sel T-CD8, menggunakan susunan peptida yang diprediksi secara *in silico* dapat berinteraksi dengan MHC-I dan MHC-II mencit BALB/c atau ddY. Respon imun selular berupa stimulasi ekspresi sitokin oleh sel T diukur dengan menghitung jumlah bintik yang terbentuk menggunakan ELISPOT reader.

## 5. Analisis Data

### Tahun I:

#### *Analisis sekuen nukleotida:*

Analisis sekuen nukleotida dilakukan dengan menggunakan piranti lunak Bioedit dan ORF-X untuk melihat tingkat homologi sekuen nukleotida *in silico* dengan susunan nukleotida yang diperoleh melalui proses sekuensing terhadap gen virus influenza A H5N1 yang terkklona pada plasmid sistem ekspresi mamalia. Tingkat kesamaan homologi harus 100% dengan semua komponen sistem ekspresi maupun kodon penyandi asam amino sesuai menunjukkan ekspresi protein dalam bentuk yang sesuai bentuk asli.

#### *Analisis ekspresi protein:*

Ekspresi protein dinilai berdasarkan adanya fluoresensi sel ditransfeksi pada uji immunofluoresens dengan analisis mikroskopi konfokal serta adanya pita reaktif spesifik pada uji Western blot dan peningkatan sinyal di atas nilai ambang pada uji ELISA.

#### *Analisis respon antibodi pada hewan coba*

Kemaknaan perbedaan respon antibodi antar kelompok hewan coba dilakukan dengan melakukan uji statistik pada nilai rerata absorbans yang diperoleh pada uji ELISA serum hewan coba, dengan membandingkan pengaruh variabel independen terhadap variabel dependen menggunakan piranti lunak SPSS.

#### *Analisis respon sel T pada hewan coba*

Kemaknaan perbedaan respon sel T CD4 dan CD8 antar kelompok hewan coba dilakukan dengan melakukan uji statistik pada nilai rerata "hitung titik" (spot counts) yang diperoleh pada uji ELISPOT PBMC hewan coba, dengan membandingkan pengaruh variabel independen terhadap variabel dependen menggunakan piranti lunak SPSS.

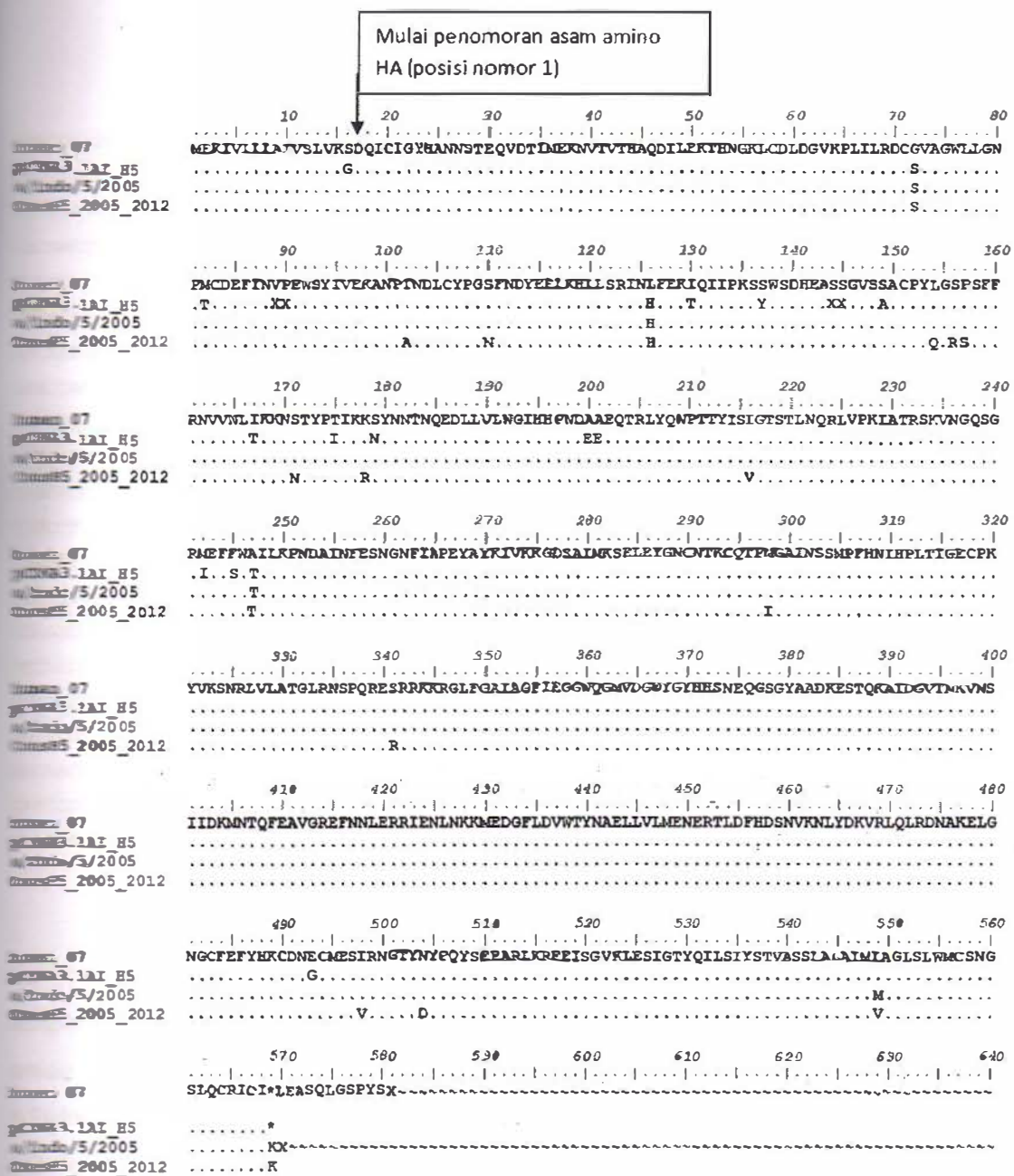
## **VI. PERTIMBANGAN ETIK PENELITIAN**

Pertimbangan etik penelitian untuk penggunaan hewan coba diajukan kepada Komite Etik Litbangkes Kementerian Kesehatan dan Komite Etik Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia

## **VII. HASIL PENELITIAN**

### **VII.1 Pembuatan sikeun konsensus dan DNA sintetik Hemagglutinin dan neuraminidase virus H5N1**

Konsensus gen Hemagglutinin dan Neuraminidase dibuat berdasarkan sikeun asam amino yang diunduh dari genbank. Kriteria yang dimasukkan adalah asal isolat dari manusia, lokasi asal sample adalah seluruh dunia, dengan tahun pengumpulan sampel 2005-2012. Setelah dilakukan pengunduhan asam amino, dilakukan penentuan sikeun konsensus menggunakan fasilitas yang disediakan oleh genbank. Sekuen konsensus yang dihasilkan selanjutnya di sejajarkan dengan asam amino isolat A/Indonesia/5/2005 dan asam amino gen HA asal manusia yang terklona dalam pcDNA3.1 (plasmid merupakan hasil penelitian konsorsium vaksin influenza), untuk mengetahui adanya keragaman hemagglutinin antar isolat. Terdapat beberapa perbedaan asam amino antara hemagglutinin isolat A/Indonesia/5/2005, yang merupakan salah satu isolat yang direkomendasikan WHO untuk *seed vaccine*, dengan protein hemagglutinin konsensus antara lain T86A, S94N, L110H, L138Q, S140R, P141S, S155N, K162R, Q200V, M282I, S325R, I482V, N488D, M533V.



Gambar 1. Hasil pensejajaran asam amino hemaglutinin isolat A/Indonesia/5/2005, Human 07 (isolat asal manusia tahun 2007), pcDNA3.1 AI\_H5 mengandung insert Hemaglutinin asal ayam, ConsH\_2005\_20012 merupakan sikeun gen hemaglutinin isolat H5N1 dari tahun 2005 sampai dengan 2012.

Selanjutnya dilakukan optimasi gen terhadap asam amino sikeun konsensus. Optimasi gen dilakukan dengan menggunakan piranti lunak DNA2.0. Optimasi ditujukan untuk menghindari kegagalan transkripsi dan translasi akibat perbedaan /bias kodon antar spesies. Berikut ini adalah hasil optimasi DNA penyandi protein hemaglutinin konsensus. Sikeun asam amino Hemaglutinin dan sikeun DNA konsensus berpotensi diajukan paten.

CGCAGAGATCGTGCTGCTGGCCATCGTGTCCCTGGTGAAGTCCGACCAGATCTGCATCGGCTACCACGCCAACCAACTC  
GAGCAGGTGGACACCATCATGGAAGAAGCTGACCGTGACCCACGCCAGGACATCCTGGAGAAGACCCACAAACGGCA  
GTGCGACCTGGACGGCGTGAAGCCCCGATCCTGAGGGACTGCTCCGTGGCCGGCTGGCTGCTGGGCAACCCCATGTGC  
GAGTTCATCAACGTGCCGAGTGGAGCTACATCGTGGAGAAGGCCAACCCCGCCAACGACCTGTGCTACCCCGGCAACTT  
GACTACGAGGAGCTGAAGCACCTGCTGTCCAGGATCAACCACTTCGAGAAGATCCAGATCATCCCCAAGAGCAGCTGGA  
CCACGAGGCCAGCAGCGGGCTGAGCAGCGCCTGCCCTACCAGGGCAGGAGCAGCTTCTTCAGGAACGTGGTGTGGCTG  
AAGAAGAACAACACCTACCCACCATCAAGAGGAGCTACAACAACACCAACCAGGAGGACCTGCTGGTGTGTGGGGCAT  
CCACCCCAACACGCCGCGGAGCAGACCAGGCTGTACCACAACCCACCACCTACATCAGCGTGGGCACCAGCACCTGA  
CAGGCTGGTGCCCAAGATCGCCAACAGAGCAAGTGAACGGCCAGAGCGGCAGGATGGAGTTCTTCTGGACCATCCTG  
GCCAACGACGCCATCAACTTCGAGAGCAACGGCAACTTCATCGCCCCGAGTACGCCTACAAGATCGTGAAGAAGGGCGA  
GCGCCATCATGAAGAGCGAGCTGGAGTACGGCAACTGCAACCAAGTGCAGACCCCATCGCGCCATCAACAGCAGCA  
GCTTCCACAACATCCACCCCTGACCATCGGCGAGTGCCCAAGTACGTGAAGAGCAACAGGCTGGTGTGTGGCCACGGC  
CGAACAGCCCCAGAGGGAGAGGAGGAAGAAGAGGGGCTGTTGCGCGCCATCGCCGGCTTCATCGAGGGCGGCTG  
GGCATGGTGGACGGCTGGTACGGCTACCACCACAGCAACGAGCAGGGCAGCGGCTACGCCCGCAAGGAGAGCACCC  
AGGGCCATCGACGGCGTGACCAACAAGTGAACAGCATCATCGACAAGATGAACACCCAGTTCGAGGGCCGTGGGCAGGGAG  
CAACCTGGAGAGGAGGATCGAGAACCTGAACAAGAAGATGGAGGACGGCTTCCTGGACGTGTGGACCTACAACGCCGA  
GCTGGTGTGATGGAGAACGAGAGGACCTGGACTTCCACGACAGCAACGTGAAGAACCTGTACGACAAGGTGAGGCTGC  
GCTGAGGGACAACGCCAAGGAGCTGGGCAACGGCTGCTTCGAGTTCTACCACAAGTGCAGAACGAGTGCATGGAGAGCGTG  
GAGGGCACCTACGACTACCCCCAGTACAGCGAGGAGCCAGGCTGAAGAGGGAGGAGATCAGCGCGTGAAGCTGGAGAG  
CACCTACCAGATCCTGAGCATCTACAGCACCGTGGCCAGCAGCCTGGCCCTGGCCATCATGGTGGCCGGCCTGAGCC  
GGATGTGCAGCAACGGCAGCCTGCAGTGCAGGATCTGCATCAAG

Konsensus asam amino Neuraminidase virus H5N1 dibuat berdasarkan sikuen asam amino yang diunduh dari genbank dan pembuatan sikuen asam amino konsensus dilakukan dengan menggunakan piranti lunak dari Genbank. Berikut ini adalah hasil pensejajaran asam amino Neuraminidase konsensus dengan asam amino neuraminidase H5N1 A/Indonesia/5/2005. Terdapat perbedaan beberapa asam amino antara konsensus dengan A/Indonesia/5/2005, pada posisi I35S, S48P, P54F, H80Y, N85S, E181G, D202N, M317V dan perubahan asam amino pada posisi 437 sampai dengan 450 yaitu WPDGAELPFTIDKY. Asam amino 437 sampai dengan 450 belum ada pada isolat A/Indonesia/5/2005 kemungkinan karena sikeunsing yang dilakukan saat itu belum sampai ke asam amino N terminal.

	10	20	30	40	50
HA_A/Indo/5/2005	MNP	QKIITIGS	ICMVIGIVSLMLQ	IGNMISIWV	IHSIQTGNQHQAESIS
ConsN1_H5N12005_2012				S	P
	60	70	80	90	100
HA_A/Indo/5/2005	NTNPLTEKAVASV	TLAGNSSLCP	IRGWA	VHSDKDNNIRIGSKG	DVVFVIREP
ConsN1_H5N12005_2012	F		Y	S	
	110	120	130	140	150
HA_A/Indo/5/2005	FISCSHLECR	TFFLTQ	GALLNDKHSNG	TVKDRSPHRTLM	SCPVGEAPSPY
ConsN1_H5N12005_2012					
	160	170	180	190	200
HA_A/Indo/5/2005	N	S	R	F	E
ConsN1_H5N12005_2012				G	
	210	220	230	240	250
HA_A/Indo/5/2005	N	D	I	L	R
ConsN1_H5N12005_2012		N			
	260	270	280	290	300
HA_A/Indo/5/2005	A	P	N	Y	H
ConsN1_H5N12005_2012					
	310	320	330	340	350
HA_A/Indo/5/2005	V	F	G	D	N
ConsN1_H5N12005_2012			V		
	360	370	380	390	400
HA_A/Indo/5/2005	F	E	M	I	W
ConsN1_H5N12005_2012					
	410	420	430	440	450
HA_A/Indo/5/2005	C	F	W	V	E
ConsN1_H5N12005_2012				W	P

Gambar 2. Hasil penjejarian asam amino neuraminidase isolat A/Indonesia/5/2005 dengan asam amino Neuraminidase konsensus yang dibuat berdasarkan isolat manusia tahun 2005 sampai dengan 2012. Terdapat perbedaan beberapa asam amino antara konsensus dengan A/Indonesia/5/2005, pada posisi I35S, S48P, P54F, H80Y, N85S, E181G, D202N, M317V dan penambahan asam amino pada posisi 437 sampai dengan 450 yaitu WPDGAELPFTIDKY. Asam amino 437 sampai dengan 450 belum ada pada isolat A/Indonesia/5/2005 kemungkinan karena sikeunsing yang dilakukan saat itu belum sampai ke asam amino N terminal.

selanjutnya dilakukan optimasi gen terhadap asam amino sikuen konsensus. Optimasi gen dilakukan dengan menggunakan piranti lunak DNA2.0. Optimasi ditujukan untuk menghindari kegagalan transkripsi dan translasi akibat perbedaan /bias kodon antar sistem terutama sistem ekspresi mamalia, prokariota dan Baculovirus. Berikut ini adalah optimasi DNA penyandi protein konsensus Neuraminidase. Sikuen Asam amino Neuraminidase dan sikuen DNA konsensus berpotensi diajukan paten.

consensus\_H5N1

```

CCCAACCAGAAGATCATCACCATCGGCAGCATCTGCATGGTGATCGGCATCGTGAGCCTGATGCTGCAGATCGGCAA
CAGCATCTGGGTGAGCCACAGCATCCAGACCGGCAACCAGCACCAGGCCAGCCATCAGCAACACCAACTTCTCTGA
AGGCCGTGGCCAGCGTGACCTGGCCGCAACAGCAGCCTGTGCCCATCAGGGGCTGGGCCGTGTACAGCAAGGAC
ATCAGGATCGGCAGCAAGGGCGACGTGTTTCGTGATCAGGGAGCCCTTCATCAGTGCAGCCACCTGGAGTGCAGGAC
CTCTCTGACCCAGGGCGCCCTGCTGAACGACAAGCACAGCAACGGCACCGTGAAGGACAGGAGCCCCACAGGACCTGA
CGCCCGTGGGCGAGGCCCCAGCCCTACAACAGCAGGTTTCGAGAGCGTGGCCTGGAGCGCCAGCGCCTGCCACGAC
CGAGTGGCTGACCATCGGCATCAGCGGCCCGACAACGGCGCCGTGGCTGTGCTGAAATACAACGGCATCATCACCGA
CAGAGCTGGAGGAACAACATCCTGAGGACCCAGGAGAGCGAGTGGCCTTGGTGAACGGCAGCTGCTTCAACCGTGA
GACGGCCCCAGCAACGGCCAGGCCAGCTACAAGATCTTCAAGATGGAGAAGGGCAAGGTGGTGAAGAGCGTGGAGCTG
CCCCCAACTACCACTACGAGGAGTGCAGCTGCTACCCCGACGCCGGCGAGATCACCTGCGTGTGCAGGGACAACCTGGCA
CAACAGGCCCTGGGTGAGCTTCAACCAGAACCTGGAGTACCAGATCGGCTACATCTGCAGCGGCGTGTTCGGCGACA
CAGGCCAACGACGGCACCGGCAGCTGCGGCCCGGTGAGCCCCAACGGCGCCTACGGCGTGAAGGGCTTCAGCTTCAAG
GCAACGGCGTGTGGATCGGCAGGACCAAGTCCACCAACTCCAGGAGCGGCTTCGAGATGATCTGGGACCCCAACGGCTG
GGCCACCGACAGCAGCTTCAGCGTGAAGCAGGACATCGTGGCCATCACCGACTGGAGCGGCTACAGCGGCAGCTTCGTGC
CCCCGAGCTGACCGCCCTGGACTGCATCAGGCCCTGCTTCTGGGTGGAGCTGATCAGGGGCAGGCCCAAGGAGAGCACC
CAGCGGCAGCAGCATCAGCTTCTGCGGCGTGAACAGCGACACCGTGAGCTGGAGCTGGCCCCGACGGCGCCGAGCT
CTCACCATCGACAAGTA

```

## 2. Pembuatan sikuen konsensus dan DNA sintetik Hemaglutinin dan neuraminidase virus H1N1 pdm

Konsensus gen Hemaglutinin dan Neuraminidase dibuat berdasarkan sikeun asam amino yang diunduh dari genbank. Kriteria yang dimasukkan adalah asal isolat dari manusia, lokasi asal sample adalah seluruh dunia, dengan tahun pengumpulan sampel 2011-2012. Setelah di lakukan pengunduhan asam amino, dilakukan penentuan sikuen konsensus menggunakan fasilitas yang disediakan oleh genbank. Sekuen konsensus yang dihasilkan selanjutnya di seajarkan dengan asam amino konsensus protein hemaglutinin yang dibuat berdasarkan isolat tahun 2009 yang kami peroleh dari penelitian didanai oleh kemenristek tahun 2009-2010. Hasil pensejajaran menunjukkan perubahan asam amino yang pada posisi 559E, konsensus asam amino H1 2010-2012 tidak memiliki asam amino pada posisi 559E, 559Y/G, 562L. Perubahan ini terutama terjadi pada bagian cytoplasmic tail.





```

      10      20      30      40      50
.....|.....|.....|.....|.....|
ConsNA_H1N1pan_2010_2012 MNPNQRIITIGSVCMTIGANLILQIGNIISIWIHSIQLGNQNQIETCN
.....|.....|.....|.....|.....|

      60      70      80      90     100
.....|.....|.....|.....|.....|
ConsNA_H1N1pan_2010_2012 QSVITYENNTWVUNQTYVNISNTNFAAGQSVVSVKLAGNSSLCPVSGWAIY
.....|.....|.....|.....|.....|

      110     120     130     140     150
.....|.....|.....|.....|.....|
ConsNA_H1N1pan_2010_2012 SKDNSIRIGSKGDVIVIREPFISCSPLECRTFFLTQGAALLNDRKHSNGTIK
.....|.....|.....|.....|.....|

      160     170     180     190     200
.....|.....|.....|.....|.....|
ConsNA_H1N1pan_2010_2012 DRSPYRTLMSCPIGEVPSPYNSRFESVAWSASACHDGINWLTIGISGPDN
.....|.....|.....|.....|.....|

      210     220     230     240     250
.....|.....|.....|.....|.....|
ConsNA_H1N1pan_2010_2012 GAVAVLKYNGIITDTIKSWRNILRTQESECACVNGSCFTVMTDQPSDGGQ
.....|.....|.....|.....|.....|

      260     270     280     290     300
.....|.....|.....|.....|.....|
ConsNA_H1N1pan_2010_2012 ASYKIFRIEKGKIYKSVEMNAPNYHYEECSYDSEITCVCRDNWBGSN
.....|.....|.....|.....|.....|

      310     320     330     340     350
.....|.....|.....|.....|.....|
ConsNA_H1N1pan_2010_2012 RPNVSNFNQLEYQIGYI CSGIFGDNPRPNDKTGSCGPVSSNGANGVKGFS
.....|.....|.....|.....|.....|

      360     370     380     390     400
.....|.....|.....|.....|.....|
ConsNA_H1N1pan_2010_2012 FRYGNGVWIGRTKSISSRNGFEMVDPNGWTGTDNNFSIKQDIVGINWS
.....|.....|.....|.....|.....|

      410     420     430     440     450
.....|.....|.....|.....|.....|
ConsNA_H1N1pan_2010_2012 GYSGSFVQHPELTGLDCIRPCFWVELIRGRPKENTIWTSGSSISFCGVNS
.....|.....|.....|.....|.....|

      460     470
.....|.....|
ConsNA_H1N1pan_2010_2012 DTVGWSWPDGAELPFTIDK-
.....|.....|

```

Gambar 4. Hasil pensejajaran asam amino konsensus neuroaminidase tahun 2009 dengan asam amino konsensus tahun 2010-2012, tidak ditemukan adanya perbedaan asam amino.

DNA penyandi asam amino konsensus neuraminidase tahun 2010-2012 dibuat dengan menggunakan program DNA2.0. Sikuen asam amino konsensus neuraminidase dan DNA penyandi asam amino neuraminidase konsensus berpotensi untuk paten. Berikut ini sikuen DNA neuraminidase konsensus.

ACCCAACCAGAAGATCATCACCATCGGCAGCGTGTGCATGACCATCGGCATGGCCAACCTGATCCTGCAGATCGGCAA  
 CAGCATCTGGATCAGCCACAGCATCCAGCTGGGCAACCAGAACCAGATCGAGACCTGCAACCAGAGCGTGATCACCT  
 CCAACACCTGGGTGAACCAGACCTACGTGAACATCAGCAACACCAACTTCGCCGCCGGCCAGAGCGTGGTGAGCGTG  
 CGGCAACAGCAGCCTGTGCCCGTGAGCGGCTGGGCCATCTACAGCAAGGACAACAGCATCAGGATCGGCAGCAA  
 CCGTGTTCGTGATCAGGGAGCCCTTCATCAGCTGCAGCCCTGGAGTGAGGACCTTCTTCCTGACCCAGGGCGCCC  
 GACAAGCACAGCAACGGCACCATCAAGGACAGGAGCCCTACAGGACCCTGATGAGCTGCCCCATCGGCGAGGTG  
 CCAACAGCAGGTTTCGAGTCCGTGGCCTGGAGCGCCAGCGCTGCCACGACGGCATCAACTGGCTGACCATCGG  
 CGGCCCCGACAACGGCGCGTGGCCGTGCTGAAGTACAACGGCATCATCACCGACACCATCAAGAGCTGGAGGAACA  
 GAGACCCAGGAGAGCGAGTGCCTGCGTGAACGGCAGCTGCTTACCCTGATGACCGACGGCCCCAGCGACGGC  
 TACAAGATCTTCAGGATCGAGAAGGGCAAGATCGTGAAGAGCGTGGAGATGAACGCCCCCAACTACCCTACGA  
 CAGCTGCTACCCCGACAGCAGCGAGATCACCTGCGTGTGCAGGGACAACGGCAGCGCAACAGGCCCTGGGTGA  
 CAGAACCTGGAGTACCAGATCGGCTACATCTGCAGCGGCATCTCGGCGACAACCCAGGCCAACGACAAGACC  
 TCGGCCCCCGTGAGCAGCAACGGCGCCAACGGCGTGAAGGGCTTCAGCTTCAAGTACGGCAACGGCGTGTGGATCGG  
 AAGAGCATCAGCAGCAGGAACGGCTTCGAGATGATCTGGGACCCCAACGGCTGGACCGGCACCGACAACAACCTCA  
 CAGGACATCGTGGGCATCAACGAGTGGAGCGGCTACAGCGGCAGCTTCGTGCAGCACCCCGAGCTGACCGGCCCTG  
 CAGGCCCTGCTTCTGGGTGGAGCTGATCAGGGGCAGGCCAAGGAGAACACCATCTGGACCAGCGGCAGCAGCAT  
 TCGCGCGTGAACAGCGACACCGTGGGCTGGAGCTGGCCCGACGGCGCCGAGCTGCCCTTACCATCGACAAG

### 3.3. Pembuatan sikeun konsensus dan sintetik Nucleoprotein

Konsensus gen Nucleoprotein dibuat berdasarkan sikeun asam amino yang diunduh dari GenBank. Kriteria yang dimasukkan adalah asal isolat dari manusia, lokasi asal sample adalah seluruh dunia, dengan tahun pengumpulan sampel 2005-2012 dan jenis virus H5N1. Setelah dilakukan pengunduhan asam amino, dilakukan penentuan sikeun konsensus menggunakan fasilitas yang disediakan oleh GenBank. Sekuen konsensus yang dihasilkan selanjutnya di sejajarkan dengan asam amino konsensus nucleoprotein asal virus H1N1 pdm tahun 2011 samapi 2012 untuk mengetahui perbedaan asam amino antar isolat. Hasil pensejajaran menunjukkan perbedaan asam amino antara H5N1 dan H1N1 pdm yaitu N26D, V39I, S40G, E59D, R83K, R106I, V111M, I125V, L142I, M195I, V196A, I223V, Y295H, R311K, F319V, E322M, T356K, R357K, V359I, Q360K, M377V, A379T, R406K, I431V, T436S, T439N, H450V, R458K, V462L, N488S, N504S, dan R505Q

```

      10      20      30      40      50
OPT_Order      MSDIEAHASQGTFRSYEQMETGGERQNAEIRASVGRMVSIGRFRFYIQMC
ConsNP_H5_2005_2012
ConsNP_H1N1pan_2009_2012      .....D.....IG.....

      60      70      80      90     100
OPT_Order      TELKLSDYEGRLIQNSITIERMVLSAFDERRNRYLEFBPSAGKDPKKTGG
ConsNP_H5_2005_2012
ConsNP_H1N1pan_2009_2012      .....D.....K.....

      110     120     130     140     150
OPT_Order      PIYRRDGRWVRELILYDKEEIRRIWRQANNQGDATAGLTHLMTBBSNLN
ConsNP_H5_2005_2012
ConsNP_H1N1pan_2009_2012      .....I...M.....V.....I.....

      160     170     180     190     200
OPT_Order      DATYQTRALVRTGADPRMCSLMQGGSTLPRRSGAAGAAVKGVGTMMVMELI
ConsNP_H5_2005_2012
ConsNP_H1N1pan_2009_2012      .....IA.....

      210     220     230     240     250
OPT_Order      RMIKRGINDRNEWRGNGRRTRIAFERMCNILKGFQTAQRAMIDQVRE
ConsNP_H5_2005_2012
ConsNP_H1N1pan_2009_2012      .....V.....

      260     270     280     290     300
OPT_Order      SRNPGNAETEDLIFLARSALILRGSVAHKSCLPACVYGLAVASGYDFERE
ConsNP_H5_2005_2012
ConsNP_H1N1pan_2009_2012      .....H.....

      310     320     330     340     350
OPT_Order      GYSLVGDIDFRLIQNSQVFSLIRPNENPAHRSQLVWMAACHSAAFEDLRVS
ConsNP_H5_2005_2012
ConsNP_H1N1pan_2009_2012      .....K.....V..M.....

      360     370     380     390     400
OPT_Order      SFIRGTRVVRGQLSTRGVQIASVENMEAMDSENTLELRSYWAIRTRSGG
ConsNP_H5_2005_2012
ConsNP_H1N1pan_2009_2012      .....KK..I...K.....V..T.....

      410     420     430     440     450
OPT_Order      NTNQQRASAGQISVQPTFSVQRNLPFERATDGAFTGNTEGRTSDMRTEI
ConsNP_H5_2005_2012
ConsNP_H1N1pan_2009_2012      .....K.....V...S..N.....V.....

      460     470     480     490     500
OPT_Order      IRMESARPEDVVSQGRGVFELSDEKATNPVPSFDMNNEGSYFFGDNAE
ConsNP_H5_2005_2012
ConsNP_H1N1pan_2009_2012      .....K...L.....S.....

OPT_Order      .....i
ConsNP_H5_2005_2012      EYDNR
ConsNP_H1N1pan_2009_2012      .....
ConsNP_H1N1pan_2009_2012      ...SQ

```

Gambar 5. Hasil pensejajaran asam amino gen Nucleoprotein yang akan digunakan dalam penelitian ini dengan asam amino konsensus NP H5N1 dan asam amino konsensus NP H1N1 pdm. Perbedaan asam amino antara NP H5N1 dan NP H1N1 pdm antara lain N26D, V39I, S40G, E59D, R83K, R106I, V111M, I125V, L142I, M195I, V196A, I223V, Y295H, R311K, F319V, I322M, T356K, R357K, V359I, Q360K, M377V, A379T, R406K, I431V, T436S, T439N, I450V, R458K, V462L, N488S, N504S, dan R505Q

DNA penyandi asam amino konsensus NP dibuat dengan menggunakan program DNA2.0. Sikuen asam amino konsensus neuraminidase dan DNA penyandi asam amino neuraminidase konsensus berpotensi untuk paten. Berikut ini sikuen DNA NP konsensus.

> NPcons\_OPT

```
ATGAGCGACATCGAGGCTATGGCCTCCCAAGGCACCAAACGCTCCTACGAGCAGATGGAGACCGGCGG
CGAAAGGCAAAACGCTACAGAAAT TAGGGCTAGCGTGGGCCGCATGGTGAGCGGCATCGGCCGCTTCT
ATATCCAGATGTGCACCGAACTGAAGCTGAGCGACTACGAAGGCCGCTGATCCAAAACAGCATCACA
ATTGAAAGGATGGTCTGTCCGCTTT CGATGAACGCCGCAACCGCTACCTGGAGGAACATCCTAGCGC
TGGCAAGGACCCCAAGAAGACC GGCGGCCCATCTATAGGAGGAGGGACGGCAAGTGGGTGC GCGGAGC
TGATCCTGTACGACAAGGAAGAAATCAGGAGGATCTGGAGGCAGGCCAACACGGCGAGGACGCCACC
GCTGGCCTGACCCACCTGATGATCTGGCACAGCAACCTGAACGACGCTACATATCAGAGGACCAGGGC
TCTGGTGAGGACCGGCATGGATCCTAGGATGTGTAGCCTCATGCAAGGCAGCACCCCTGCCCAGGAGGT
CCGGCGCTGCTGGCGTGCTGTCAAAGGCGTGGGCACAATGGTGATGGAGCTGATCCGCATGATCAAG
AGGGGCATCAACGACAGGAACTTCTGGAGGGGCGAGAACGGCAGGAGGACAAGGATTGCTTATGAAAG
GATGTGTAATATCCTGAAGGGCAAGTTCAGACCGCTGCTCAAAGGGCTATGATGGACCAAGTCAGGG
AAAGCAGGAACCCCTGGCAACGCTGAAATTGAGGACCTGATCTTCCTGGCTAGGAGCGCTCTGATTCTG
AGGGGCTCCGTGGCTCACAAGAGCTGTCTGCCTGCTTGCCTGTACGGCCTGGCTGTGCTAGCGGCTA
CGATTTTGAAAGGGAAGGCTACAGCC TGGTGGGCATCGATCCTTTCAGGCTGCTGCAAAAACAGCCAAG
TGTTTCAGCCTGATCAGGCCTAACGAAAATCCTGCTCACAAAAGCCAACTCGTGTGGATGGCTTGCCAT
AGCGCTGCTTTTGAAGATCTCAGGGTGAGCAGCTTCATCAGGGGCACAAGGGTGGTGCCTAGGGGCCA
ACTGAGCACACGCGCGTGCAGATCGCCAGCAACGAGAACATGGAGGCCATGGACAGCAACACCCTGG
AGCTGAGGAGCCGCTACTGGGCTATCAGGACCAGGAGCGGCGCAACACCAACCAGCAGAGGGCTAGC
GCTGGCCAGATCAGCGTGCAACCTACATTTAGCGTGC AAAGGAACCTGCCTTT CGAACGCGCTACAAT
CATGGCTGCTTTTACAGGCAACACAGAAGGCAGGACATCCGATATGAGGACAGAAATTATTAGGATGA
TGGAAAGCGCTAGGCCTGAAGACGTGTCTTCCAGGGCCGCGGCGTGTTCGAGCTGAGCGACGAGAAG
GCTACAAACCCTATTGTCCCTTCTTTGACATGAACAACGAAGGCAGCTACTTCTTCGGCGACAACGC
TGAAGAATATGATAACAGG
```

#### V.4. Pembuatan DNA sintetik Lysteriolisin

Hasil pensejajaran asam amino listeriolislin tidak menunjukkan ada perbedaan asam amino listeriolislin yang diunduh dari genbank dengan asam amino hasil translasi gen listeriolislin yang telah dioptimasi kodon untuk sistem mamalia.

```

          10      20      30      40      50
Lysteriolisin_M24199_M29030 MKKIMLVFITLILVSLPIAQQTAKDASAFNKENSISSMAPPASPPASPK
lysteriolisinORD
          60      70      80      90     100
Lysteriolisin_M24199_M29030 TPIEKKHADEIDKYIQGLDYNKNNVLYHGDAVTNVPFRKGYKDGNEYIV
lysteriolisinORD
          110     120     130     140     150
Lysteriolisin_M24199_M29030 VEKCKKSINQNNADIQVVNAISSLTYPGALVKANSELVENQPDVLPVKRD
lysteriolisinORD
          160     170     180     190     200
Lysteriolisin_M24199_M29030 SITLSIDLPGMTNQDNKIVVKNATKSNVNNAVNTLVERWNEFYAQAYPNV
lysteriolisinORD
          210     220     230     240     250
Lysteriolisin_M24199_M29030 SAKIDYDEMAYESQLIAKFGTAFKAVNNSLNVNFGAISEGKMQEEVIS
lysteriolisinORD
          260     270     280     290     300
Lysteriolisin_M24199_M29030 FKQIYYNVVNEPTRPSRFFGKAVTKEQLQALGVNAENPPAYISSVAYGR
lysteriolisinORD
          310     320     330     340     350
Lysteriolisin_M24199_M29030 QVYLLKLSINSHSTKVKRAAFDAAVSGKSVSGDVELTNIIRNSSFKAVYGG
lysteriolisinORD
          360     370     380     390     400
Lysteriolisin_M24199_M29030 SAKDEVQIIDGNLGLDRDILKKGATFNRETPGVPIAYTTNFKDNELAVI
lysteriolisinORD
          410     420     430     440     450
Lysteriolisin_M24199_M29030 KNNSEYIETTSKAYTDGKINIDBSGGYVAQFNISWDEVNVDPEGNEIVQH
lysteriolisinORD
          460     470     480     490     500
Lysteriolisin_M24199_M29030 KNWSENNKSKLAHFTSSIYLPGNARNINVYAKECTGLAWEWRTVIDDRN
lysteriolisinORD
          510     520
Lysteriolisin_M24199_M29030 LPLVKNRNISIWGTTLYPKYSNKVDNPIE
lysteriolisinORD

```

Gambar 5. Hasil pensejajaran asam amino lysteriolysin yang diunduh dari genbank dengan asam amino hasil traslasi gen sintetik ayng telah dioptimasi untuk sistem mamalia menunjukkan tidak ditemukan adanya perbedaan asam amino antara lysteriolisin yang diunduh dari genbank dengan hasil translasi gen lysteriolisin sintetilk.

Selanjutnya asam amino listeriolisin dibuat sikuen DNANYa dengan bantuan piranti lunak DNA.2.0 dan dioptimasi untuk sistem mamali, berikut ini adalah sikuen DNA penyandi Esteriolisin. Sikuen asam amino dan DNA yang dihasilkan dalam penelitian ini berpotensi paten.

>lysteriolisinORD

```
ATGAAGAAGATCATGCTGGTGTTCATCACCCCTGATCCTGGTGAGCCTGCCCATCGCC
CAGCAGACCGAGGCCAAGGACGCCAGCGCCTTCAACAAGGAGAACAGCATCAGCAGC
ATGGCCCCCCCCGCCAGCCCCCGCCAGCCCCAAGACCCCCATCGAGAAGAAGCAC
GCCGACGAGATCGACAAGTACATCCAGGGCCTGGACTACAACAAGAACAACGTGCTG
GTGTACCACGGCGACGCCGTGACCAACGTGCCCCCTAGGAAGGGCTACAAGGACGGC
AACGAGTACATCGTGGTGGAGAAGAAGAAGAAGAGCATCAACCAGAACAACGCCGAC
ATCCAGGTGGTGAACGCCATCAGCAGCCTGACCTACCCCGGCGCCCTGGTGAAGGCC
AACAGCGAGCTGGTGGAGAACCAGCCCGACGTGCTGCCCCGTGAAGAGGGACAGCCTG
ACCCTGAGCATCGACCTGCCCGGCATGACCAACCAGGACAACAAGATCGTGGTGAAG
AACGCCACCAAGAGCAACGTGAACAACGCCGTGAACACCCTGGTGGAGAGGTGGAAC
GAGAAGTACGCCCAGGCCTACCCCAACGTGAGCGCCAAGATCGACTACGACGACGAG
ATGGCCTACAGCGAGAGCCAGCTGATCGCCAAGTTCGGCACCCGCTTCAAGGCCGTG
AACAACAGCCTGAACGTGAACCTCGGCGCCATCAGCGAGGGCAAGATGCAGGAGGAG
GTGATCAGCTTCAAGCAGATCTACTACAACGTGAACGTGAACGAGCCCACCAGGCCC
AGCAGGTTCTTCGGCAAGGCCGTGACCAAGGAGCAGCTGCAGGCCCTGGGCGTGAAC
GCCGAGAACCCCCCGCCTACATCAGCAGCGTGGCCTACGGCAGGCAGGTGTACCTG
AAGCTGAGCACCAACAGCCACAGCACCAAGGTGAAGGCCGCTTCGACGCCGCGGTG
AGCGGCAAGAGCGTGAGCGGCGACGTGGAGCTGACCAACATCATCAAGAACAGCAGC
TTCAAGGCCGTGATCTACGGCGGCAGCGCCAAGGACGAGGTGCAGATCATCGACGGC
AACCTGGGCGACCTGAGGGACATCCTGAAGAAGGGCGCCACCTTCAACAGGGAGACC
CCCGGCGTGCCCATCGCCTACACCACCAACTTCC TGAAGGACAACGAGCTGGCCGTG
ATCAAGAACAACAGCGAGTACATCGAGACCACCAGCAAGGCCTACACCGACGGCAAG
ATCAACATCGACCACAGCGGCGGCTACGTGGCCCAGTTCAACATCAGCTGGGACGAG
GTGAACTACGACCCCGAGGGCAACGAGATCGTGCAGCACAAGA ACTGGAGCGAGAAC
AACAAGAGCAAGCTGGCCCACTTCAACCAGCAGCATCTACCTGCCCGGCAACGCCAGG
AACATCAACGTGTACGCCAAGGAGTGCACCGGCCTGGCCTGGGAGTGGTGGAGGACC
GTGATCGACGACAGGAACCTGCCCTGGTGAAGAACAGGAACATCAGCATCTGGGGC
ACCACCCTGTACCCCAAGTACAGCAACAAGGTGGACAACCCCATCGAG
```

## 5.5. Pembuatan DNAsintetik fusi SPD-CD40L human

Fusi SPD\_CD40L dilakukan dengan cara mengunduh sekuens mRNA penyandi protein surfactan protein D manusia diunduh dari gen bank dengan nomor akses NM\_003019 versi NM\_003019.4 GI:61699225. Sekuens mRNA penyandi protein CD40L manusia diunduh dari gen bank dengan nomor akses NM\_000074 versi NM\_000074.2 GI:58331233. Fusi gen mengandung sinyal peptide yang diperlukan supaya protein dapat diekspresikan di membran sel. Sinyal peptide berada pada bagian C terminal. Gen SpD yang diambil dalam fusi ini merupakan bagian yang dapat membentuk struktur trimer. Hal ini ditujukan supaya CD40L yang terfusi dibagian N terminal SPD dapat membentuk struktur trimer, karena fungsi biologis CD40L ditentukan oleh struktur polimeranya. Bagian CD40L yang difusi merupakan bagian globular, yang merupakan bagian fungsional CD40L. Bagian transmembrane CD40L tidak diikuti sertakan dalam pembuatan fusi. Fusi yang dilakukan dalam penelitian ini berbeda dengan penelitian terdahulu yang memfusikan SPD secara utuh dengan CD40L. Berikut ini adalah hasil pensejajaran asam amino fusi SPD\_CD40L, CD40L dan SPD.

	10	20	30	40	50
FusiSPD_CD40L	MLLFLLSALVLLTQPLGYLEAGMKTYSHRTMPSACTLVMCSSLVSGLPGR				
CD40LHuman	MLLFLLSALVLLTQPLGYLEAGMKTYSHRTMPSACTLVMCSSLVSGLPGR				
SPDhuman	MLLFLLSALVLLTQPLGYLEAGMKTYSHRTMPSACTLVMCSSLVSGLPGR				
	60	70	80	90	100
FusiSPD_CD40L	DGRDGRGPRGPKGDPGLPGAAGAGMPGQAGPVGPKGDNGSVGEPGPRG				
CD40LHuman	DGRDGRGPRGPKGDPGLPGAAGAGMPGQAGPVGPKGDNGSVGEPGPRG				
SPDhuman	DGRDGRGPRGPKGDPGLPGAAGAGMPGQAGPVGPKGDNGSVGEPGPRG				
	110	120	130	140	150
FusiSPD_CD40L	DTGPGSPGPPGVGPGAGREGPLGRQGNIGPQKPKGELAGPKGEVGAPE				
CD40LHuman	DTGPGSPGPPGVGPGAGREGPLGRQGNIGPQKPKGELAGPKGEVGAPE				
SPDhuman	DTGPGSPGPPGVGPGAGREGPLGRQGNIGPQKPKGELAGPKGEVGAPE				
	160	170	180	190	200
FusiSPD_CD40L	GMQGSAGARLAGPKGERGVPERGVPGNTGAAGSAGAMPQGSPPGARGP				
CD40LHuman	GMQGSAGARLAGPKGERGVPERGVPGNTGAAGSAGAMPQGSPPGARGP				
SPDhuman	GMQGSAGARLAGPKGERGVPERGVPGNTGAAGSAGAMPQGSPPGARGP				
	210	220	230	240	250
FusiSPD_CD40L	PGLKGDKGI PGDKGAKGESGLPDVASLRQQVEALQGVQHLQAAFSQYKK				
CD40LHuman	-----MIETYNQTSRPSAATGLPISMKIFMYLLTVFLITQMI				
SPDhuman	PGLKGDKGI PGDKGAKGESGLPDVASLRQQVEALQGVQHLQAAFSQYKK				
	260	270	280	290	300
FusiSPD_CD40L	VELFSGGSLHRRLDKIEDERNLHEDFVFMKTIQRCNTGERSLSLLNCEEI				
CD40LHuman	GSAFVAVYLHRRLDKIEDERNLHEDFVFMKTIQRCNTGERSLSLLNCEEI				
SPDhuman	VELFVNGQSVGERIFKTAGFVKKPTEAQLLCTQAGGOLASPRSAENNAL				
	310	320	330	340	350
FusiSPD_CD40L	KSQFEGFVKDIMLNKEETHKENSFEMQKGDQNPQIAAHVISEASSKTTSV				
CD40LHuman	KSQFEGFVKDIMLNKEETHKENSFEMQKGDQNPQIAAHVISEASSKTTSV				
SPDhuman	QQLVVARNEAFLSNPDSRTEGKFTYPTGESLVYSNNAPGEPNDDGGSSE				
	360	370	380	390	400
FusiSPD_CD40L	LQWAEKGYTMSNNLVPLENGKQLTVKRQGLYYTYAQVTFCSNREASSQA				
CD40LHuman	LQWAEKGYTMSNNLVPLENGKQLTVKRQGLYYTYAQVTFCSNREASSQA				
SPDhuman	CVEIFVNGKWNDRACGERRIVCEY				
	410	420	430	440	450
FusiSPD_CD40L	PFIASLCLKSPGRFERILLRAANTHSSAKPCGQSIHLGGVFELQPGASV				
CD40LHuman	PFIASLCLKSPGRFERILLRAANTHSSAKPCGQSIHLGGVFELQPGASV				
SPDhuman	PFIASLCLKSPGRFERILLRAANTHSSAKPCGQSIHLGGVFELQPGASV				
	460	470			
FusiSPD_CD40L	FVNVTDPQVSHGTGFTSFGLLKL				
CD40LHuman	FVNVTDPQVSHGTGFTSFGLLKL				
SPDhuman	FVNVTDPQVSHGTGFTSFGLLKL-				

Gambar 6 . Pensejajaran asam amino fusi SPD\_CD40L dengan SPD dan CD40L asal manusia. Sikuen asam amino SPD berada dalam kotak warna biru, pada sikuen fusi SPD\_CD40L dipisahkan oleh asam amino GGGs, sikuen asam amino CD40L berada dalam kotak warna kuning.

Gen penyandi asam amino protein fusi SPD\_CD40L selanjutnya disusun dengan menggunakan piranti lunak DNA2.0. Berikut ini adalah sikeun DNA penyandi protein fusi SPD\_CD40L.

> HumanSPD-CD40L

```
ATGCTGCTCTTCTCCTCTCTGCACTGGTCCTGCTCACACAGCCCCTGGGCTACCTGGPAGCAGGAATGAAGACCTACTCCCA
CAGAACCATGCCAGTGCCTTGCAACCCTGGTCATGTGTAGCTCAGTGGAGAGTGGCCTGCCTGGTCGCATGGACGGGATGGGA
GAGAGGGCCCTCGCGGCAGAAAGGGCGACCCAGGTTTGCAGGAGCTGCAGGGCAAGCAGGGATGCCTGGACAAGCTGGCCCA
GTTGGCCCCAAAGGGGACAATGGCTCTGTTGGAGAACCTGGACCAAGGGGAGACTGGGCCAAGTGGACCTCCAGGACCTCC
CGGTGTGCCTGGTCCAGCTGGAAGAGAAGGTCCCCTGGGGAAGCAGGGGAACATAGGACCTCAGGGCAAGCCAGGCCCCAAAAG
GAGAAGCTGGCCCCAAAGGAGAAAGTAGGTGCCCCAGGCATGCAGGGCAGCGCAGGGGCPAGAGGCCTCGCAGGCCCTAAGGGA
GAGCGAGGTGTCCCTGGTGTAGCGAGGAGTCCCTGGAACACAGGGGCAGCAGGGTCTGCTGGAGCCATGGGTCCCAGGGAAG
TCCAGGTGCCAGGGGACCCCCGGGATTGAAGGGGGACAAAGGCAATCCTGGAGACAAAGGAGCAAAGGGAGPAAAGTGGGCTTC
CAGATGTTGCTTCTCTGAGGCAGCAGGTTGAGGCCCTGCAAGGACAAGTACAGCACCTCCAGGCTGCTTTCTCTCAGTATAAG
AAAGTTGAGCTCTTCGGAGGTGGATCTCTTCATAGAAGGTGGACAAGATAGAAGATGAAAGGAATCTCCATGAAGATTTTGT
ATTCATGAAAACCATCCAGCGGTGTAACACCGGCGAAAGATCCCCTGTCCCTGCTCAACTGCGAAGAGATTAAGAGCCAGTTTG
AAGCTTTGTGAAGGATATAATGCTGAACAAGAGGAGACCAAGAAAGAAACAGCTTTGAAATGCAAAAGGCGATCAGAAT
CCTCAAATTGCTGCTCACGTCATAAGCGAGGCTAGCAGCAAAACAACATCTGTGCTGCAGTGGGCTGAAAAGGATACTACAC
CATGTCCAATAATCTGGTAACCCTGGAATAATGGGAAACAGCTGACCGTTAAAGACAAGGACTCTATTATATCTATGCCCAAG
TCACCTTCTGTTCCAATCGGGAAGCTAGCAGCCAAGCTCCTTTTATAGCCAGCCTCTGCCTGAAGTCCCCGGCAGATTCGAG
AGAATCCTGCTCCGGGTGCTAATACCCACTCCTCCGCCAAACCTTGCGGCCAAACATCCATTACCTGGGCGGCGTGTTCGA
GCTGCAGCCTGGCGCCTCCGTGTTTGTGAATGTGACAGATCCTAGCCAAGTGAGCCATGGCACAGGCTCACATCCTTTGGCC
TCCTCAAACCTC
```

#### V.6. Perancangan dan Konstruksi vektor pengeksresi vaksin DNA berfusi dengan gen adjuvant.

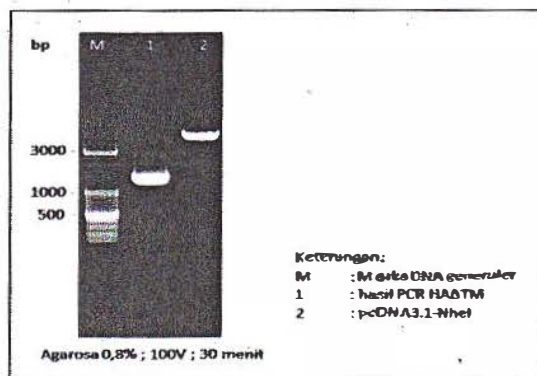
Gen penyandi protein adjuvant yaitu gen VP22 penyandi protein VP22, gen C3b atau P28 penyandi protein C3b (P28). Gen akan di klonasi secara berfusi pada bagian C terminal protein Hemagglutinin, menggantikan posisi *Transmembrane* dan *Cytoplasmic tail* sehingga protein yang dihasilkan merupakan protein hemagglutinin berfusi dengan gen penyandi VP22 atau P28. Dalam penelitian ini kemampuan hemagglutinin untuk membentuk struktur trimeric tidak dihilangkan, sehingga protein fusi yang dihasilkan akan dapat membentuk struktur trimer dan protein adjuvant akan ada dalam keadaan multimer.

Gen adjuvant CD40L akan dibuat dengan memfusikan surface protein D pada bagian N terminal CD40L. gen fusi selanjutnya akan diklonasi dalam vektor pcDNA3.1, sehingga akan diperoleh pCDNA3.1SPD-CD40L. Saat digunakan sebagai adjuvant, plasmid pCDNA3.1SPD-CD40L akan dimasukkan/disuntikkan bersama-sama dengan DNA vaksin. Diharapkan penyuntikan plasmid penyandi protein CD40L akan meningkatkan respon kekebalan humoral.

Adjuvant Lysteriolisin dibuat berdasarkan kemampuan lysteriolisin untuk melepaskan diri dari endosom sehingga protein tidak dihancurkan oleh protease lisosom. Dalam penelitian ini gen lysteriolisin akan diklonasi dalam vektor ekspresi prokariota. Protein lysteriolisin akan ditambahkan pada saat formulasi vaksin DNA, Baculovirus atau protein subunit.

#### V.7. Pengklonaan gen HA-H5N1 tanpa daerah transmembran dan *cytoplasmic tail* (HA $\Delta$ CTM) ke dalam vektor plasmid pcDNA3.1(+)

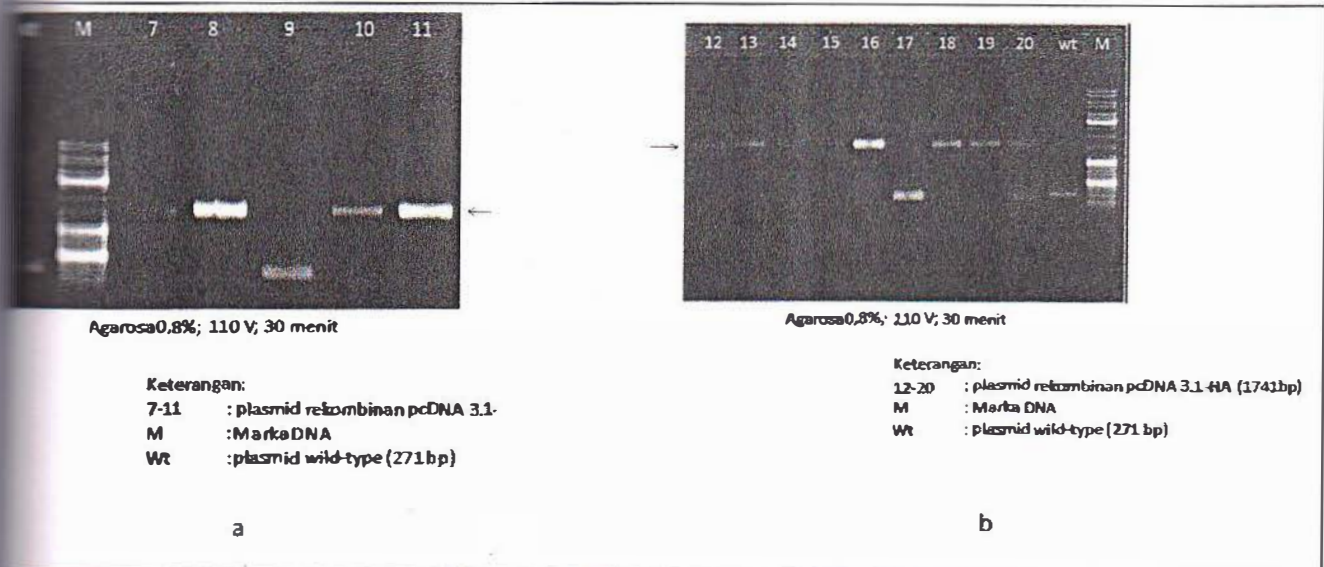
Fragmen gen HA H5N1 tanpa daerah *cytoplasmic tail* dan transmembran domain diamplifikasi menggunakan teknik PCR dengan template berupa fragmen gen HA full yang telah diklonasi ke dalam plasmid pcDNA3.1(+). Ukuran pita DNA yang diharapkan dari hasil amplifikasi adalah  $\pm$  1400 bp. Gambar 7 menunjukkan hasil amplifikasi DNA sisipan dan pemotongan DNA vektor.



Gambar 7. Persiapan DNA vektor dan insert HA $\Delta$ TM

DNA insert dan vektor yang telah direstriksi dengan enzim restriksi *NheI* dan *EcoRI* kemudian dipurifikasi dan diisolasi menggunakan 0,8% *Low Melting Agarosa* dan diligasi dengan perbandingan DNA sisipan:vektor = 3:1.

Seleksi menggunakan teknik PCR koloni dengan pasangan primer yang mengamplifikasi daerah MCS vektor. Gambar 8 menunjukkan bahwa 12 dari 14 klon teridentifikasi positif mengandung sisipan HAΔTM.



Gambar 8. Hasil verifikasi PCR dari pcDNA3.1 HAΔTM

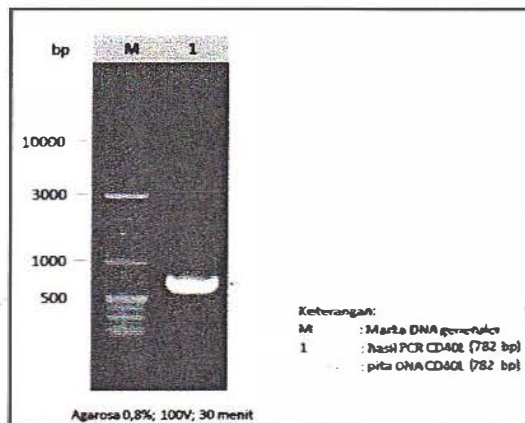
Salah satu klon, yaitu pcDNA3.1(+)-HAΔTM(13) diverifikasi sekuensing dan menunjukkan kesesuaian DNA sisipan dengan template gen HA H5N1. Hasil sekuensing menunjukkan bahwa gen HA telah berhasil diklonasi ke dalam plasmid pcDNA3.1(+). (Gambar 9). Plasmid kemudian diperbanyak dan disimpan dalam bentuk stok kultur.

	10	20	30	40	50	60
HAH5	ATGGAGAAAATAGTGCTTCTTCTTGCAATAGTCAGTCTTGTAAAAAGTGATCAGATTTGCAT					
	M E K I V L L L A I V S L V K S D O I C I					
pcDNA3.1HATM	ATGGAGAAAATAGTCCTTCTTCTTGCAATAGTCAGTCTTGTAAAAAGTGATCAGATTTGCAT					
	M E K I V L L L A I V S L V K S D O I C I					
	80	90	100	110	120	130
HAH5	ATGCAAAACAATTCAACAGAGCAGGTTGACACAATCATGGAAAAGAACGTTACTGTTACACAT					
	H A N N S T E V D T I M E K N V T V T H					
pcDNA3.1HATM	ATGCAAAACAATTCAACAGAGCAGGTTGACACAATCATGGAAAAGAACGTTACTGTTACACAT					
	H A N N S T E Q V D T I M E K N V T V T H					
	150	160	170	180	190	200
HAH5	CATACTGGAAAAGACACACAACGGGAAGCTCTGCGATCTAGATGGAGTGAAGCCTCTAATTT					
	I L E K T H N G K L C D L D G V K P L I					
pcDNA3.1HATM	CATACTGGAAAAGACACACAACGGGAAGCTCTGCGATCTAGATGGAGTGAAGCCTCTAATTT					
	I L E K T H N G K L C D L D G V K P L I					
	220	230	240	250	260	270
HAH5	TG TAGTGTAGCTGGATGGCTCCTCGGGAACCCAATGTGTGACGAATTCATCAATGTACCGGA					
	C S V A G W L L G N P M C D E F I N V P E					
pcDNA3.1HATM	TG TAGTGTAGCTGGATGGCTCCTCGGGAACCCAATGTGTGACGAATTCATCAATGTACCGGA					
	C S V A G W L L G N P M C D E F I H V P E					
	290	300	310	320	330	340
HAH5	ACATAGTGGAGAAGGCCAATCCAACCAATGACCTCTGTTACCCAGGGAGTTTCAACGACTAT					
	Y I V E K A N P T N D L C Y P G S F N D Y					
pcDNA3.1HATM	ACATAGTGGAGAAGGCCAATCCAACCAATGACCTCTGTTACCCAGGGAGTTTCAACGACTAT					
	Y I V E K A N P T N D L C Y P G S F N D Y					
	350	370				
HAH5	GAAACACCTATTGAGCAGAATAAACCA					
	K H L L S R I N					
pcDNA3.1HATM	GAAACATCTATTGAGCCGAATAAACCA					
	K H L L S R I N					

Gambar 9. Hasil alignment pcDNA3.1(+) $\Delta$ TM

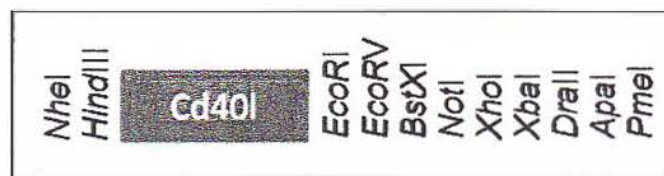
## V.8. Pengklonaan adjuvan gen Cd40L ke dalam vektor plasmid pcDNA3.1(+)

Sintesis DNA sisipan CD40L yang menyandi protein CD40L dilakukan melalui proses amplifikasi *polymerase chain reactor reverse transcriptase* (RT-PCR) menggunakan RNA yang diekstraksi dari sel PMBC mencit sebagai materi genetik pola cetaknya. Amplifikasi DNA penyandi protein CD40L menggunakan reagen *One Step RT-PCR Superscript II/ITaq Platinum* dan pasangan primer *MSCD40L\_F1* dan *CD40L\_F2*. Gambar 10 menunjukkan hasil PCR dari DNA sisipan Cd40l.



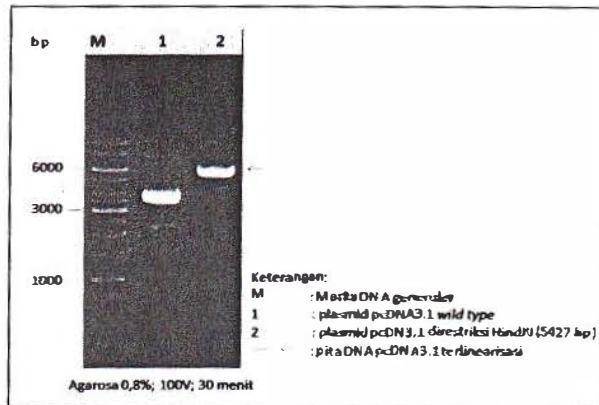
Gambar 10. Hasil PCR CD40L

DNA adjuvan Cd40l akan diklona ke dalam plasmid ekspresi mamalia pcDNA3.1 dengan situs restriksi *HindIII* dan *EcoRI*. Gambar 11 menunjukkan skema pengklonaan DNA adjuvan Cd40l ke dalam vektor pcDNA3.1.



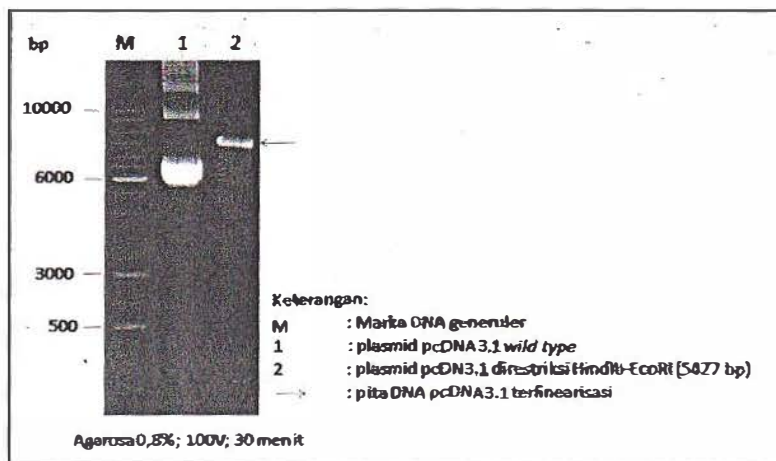
Gambar 11. Skema pengklonaan DNA adjuvan CD40L dalam vektor pcDNA3.1

Plasmid pcDNA3.1(+) pertama-tama direstriksi dengan enzim restriksi *HindIII* selama 16 jam. Hasil yang diharapkan adalah plasmid terlinearisasi, kemudian dipurifikasi menggunakan QIAEXII gel extraction kit dengan metode desalting. Gambar 12 menunjukkan plasmid pcDNA3.1 yang telah direstriksi dengan *HindIII* dan dipurifikasi menggunakan kit tersebut.



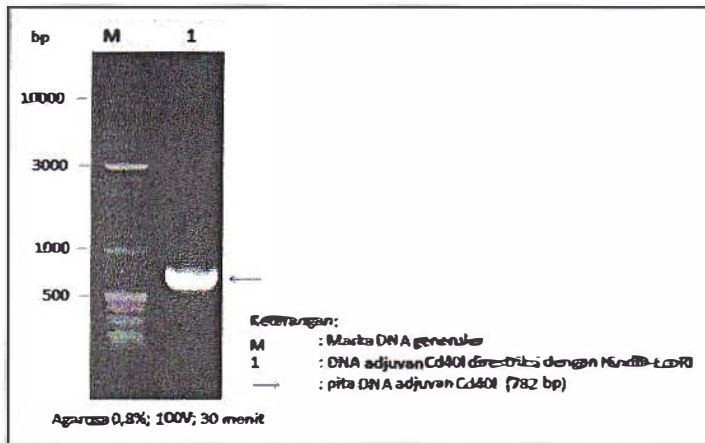
Gambar 12. Restriksi plasmid pcDNA3.1 dengan HindIII.

Plasmid pcDNA 3.1(+) yang telah dilinearkan dengan *HindIII* kemudian direstriksi kembali dengan *EcoRI*. Pengklonaan menggunakan dua enzim restriksi memiliki keuntungan yaitu tidak diperlukan verifikasi orientasi DNA sisipan. Gambar 13 menunjukkan hasil restriksi pcDNA3.1 *HindIII* dengan *EcoRI*



Gambar 13. Hasil purifikasi restriksi plasmid pcDNA3.1 dengan *HindIII* dan *EcoRI*

DNA sisipan CD40L yang telah berhasil diamplifikasi juga harus direstriksi dengan enzim restriksi *HindIII* dan *EcoRI*. Gambar 14 menunjukkan hasil purifikasi DNA sisipan setelah direstriksi dengan kedua enzim restriksi tersebut.



Gambar 14. DNA sisipan CD40L direstriksi dengan *HindIII* dan *EcoRI*

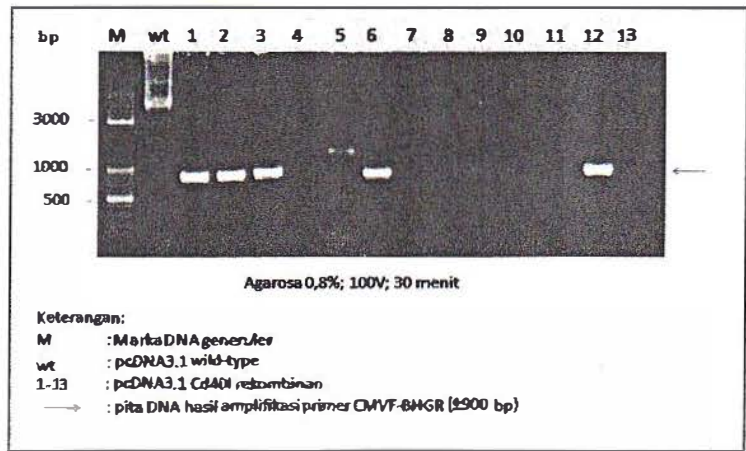
DNA plasmid dan sisipan yang telah diisolasi menggunakan *Low Melting Agarosa* kemudian diligasi dengan enzim *T4 DNA ligase*. Perbandingan DNA vektor dan sisipan adalah 1:3. Campuran reaksi ligasi diinkubasi pada suhu 16°C *overnight*. Hasil ligasi akan ditransformasi ke dalam sel *Escherichia coli* TOP10 kompeten. Proses transformasi menggunakan metode heat shock. Pertumbuhan bakteri terlihat berupa koloni putih pada *plate* sebaran hasil ligasi pcDNA 3.1(+) dengan CD40L, menunjukkan keberhasilan ligasi. Namun demikian, perlu verifikasi lebih lanjut apakah koloni yang tumbuh membawa DNA sisipan *CD40L*. Koloni putih juga tumbuh pada kontrol positif transformasi, yaitu pcDNA 3.1(+) *wildtype* (10 ng/μl) (Tabel 1). Kontrol negatif transformasi yang hanya berisi sel kompeten *E. coli* TOP10 tidak menunjukkan pertumbuhan sama sekali. Hasil perhitungan efisiensi transformasi menunjukkan efisiensi yang tinggi yaitu sebesar  $8,25 \times 10^5$  cfu/μg.

Tabel 1. Jumlah koloni hasil transformasi

Hasil transformasi	Jumlah koloni
Transformasi hasil ligasi pcDNA 3.1(+) - <i>Cd40l</i> (50 μl)	5
Transformasi hasil ligasi pcDNA 3.1(+) - <i>Cd40l</i> (200 μl)	23
Kontrol ligasi pcDNA 3.1(+) - <i>Cd40l</i>	-
Kontrol positif pcDNA 3.1(+) <i>wildtype</i> (10 ng/μl)	1650
Kontrol negatif transformasi (sel kompeten)	-

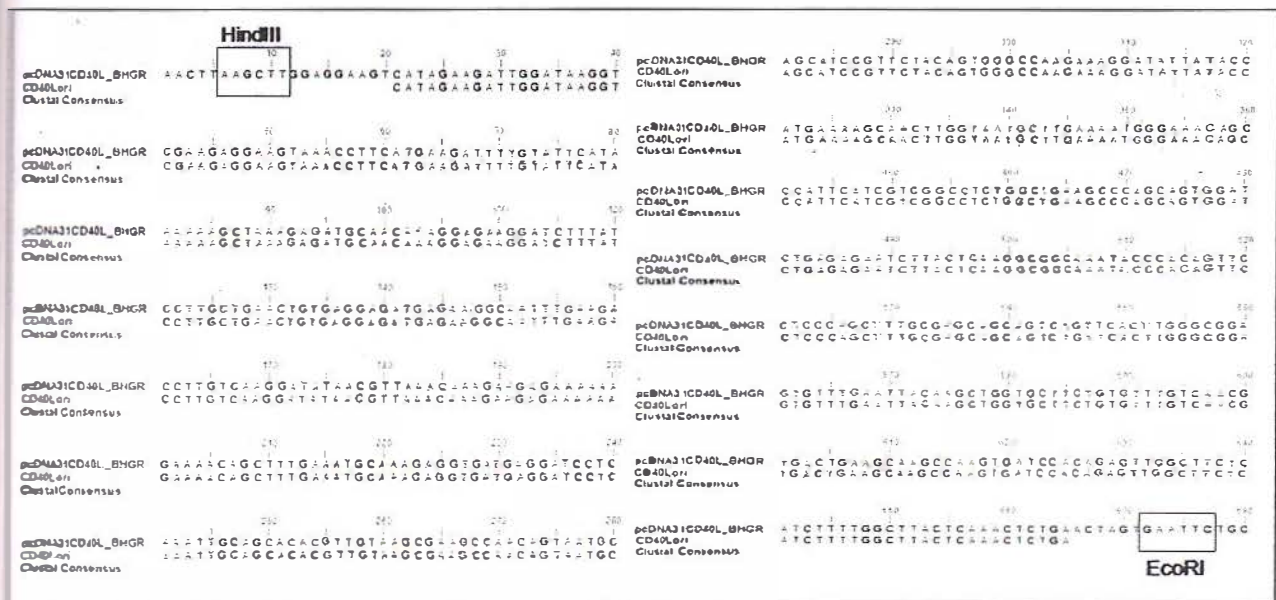
Verifikasi DNA rekombinan dengan teknik PCR koloni menggunakan pasangan primer vektor yaitu CMV\_F dan BHG\_R, pasangan primer tersebut akan mengapit daerah vektor yang membawa DNA sisipan. Hasil analisis pada gel agarosa 0,8% menggunakan marka *gene ruler DNA ladder mix* menunjukkan adanya pita DNA pada lajur 1--3, 6, dan 12 yang bermigrasi hampir sejajar dengan marka DNA 900 pb dan kemungkinan merupakan insert

CD40L. Visualisasi agarosa 0,8% hasil amplifikasi PCR koloni rekombinan dapat dilihat pada gambar 15.



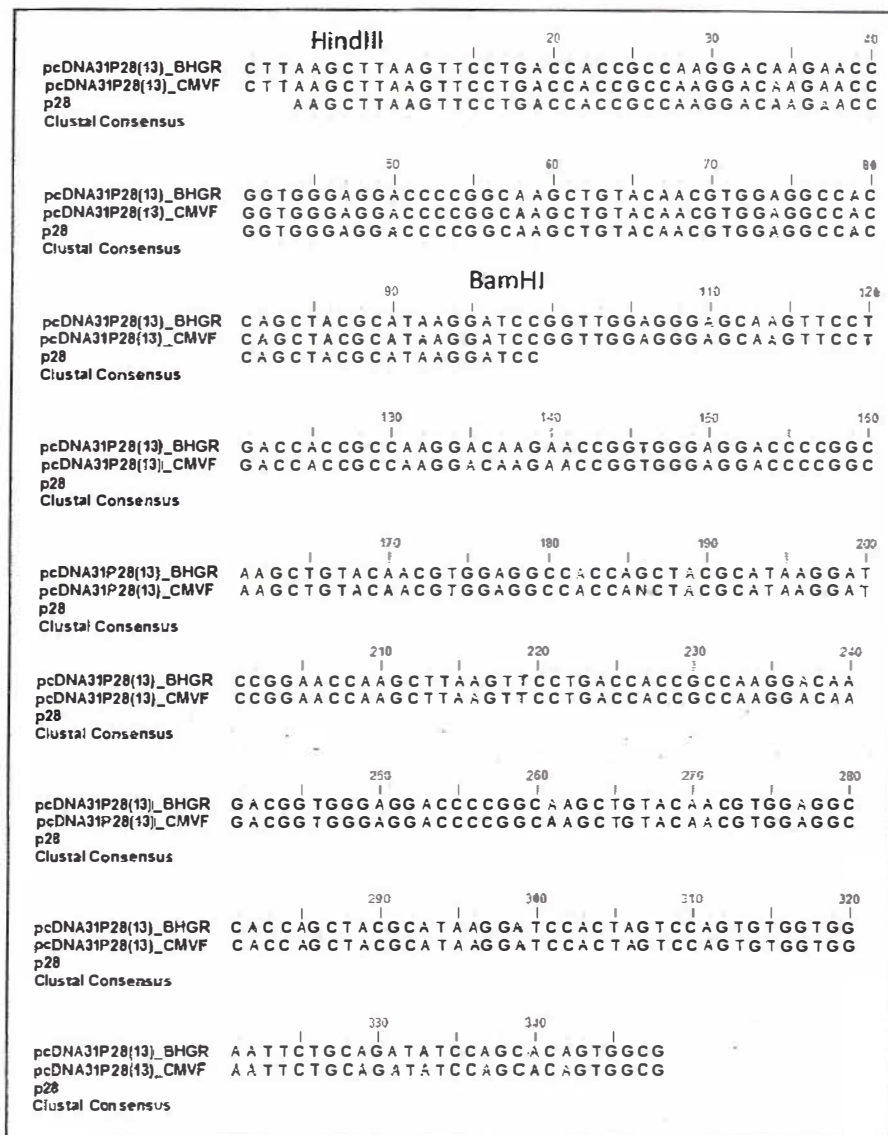
Gambar 15. PCR koloni plasmid rekombinan

Sebanyak 2 plasmid rekombinan pcDNA3.1-Cd40L yang positif mengandung sisipan CD40L dengan verifikasi PCR kemudian dikultur ke dalam 4 ml media Luria Bertani cair dan diisolasi plasmid untuk kemudian diverifikasi dengan sekuensing. Hasil sekuensing gen CD40L telah berhasil diklona ke dalam plasmid pcDNA3.1. Gambar 16 menunjukkan hasil pensejajaran plasmid rekombinan dengan sekuen CD40L awal.



Gambar 16. Hasil alignment DNA sisipan dengan gen CD40L *mus musculus*

Plasmid pcDNA3.1-Cd40L yang telah terverifikasi dengan sekuensing kemudian akan diisolasi skala besar dan dibuat stok kultur untuk digunakan pada penelitian selanjutnya.



Gambar 19. Hasil sekuensing plasmid pcDNA-P28(13)

Sisa ligasi kemudian ditransformasi ulang, kemudian dilakukan seleksi koloni terhadap plasmid rekombinan yang dihasilkan. Verifikasi sekuensing terhadap plasmid pcDNA3.1-P28(5) menunjukkan bahwa fragmen P28 telah berhasil diklonasi ke dalam plasmid pcDNA3.1(+) (Gambar 20).

```

          10          20          30          40          50          60          70
P28(5)_CMVF AAGCTTAAGTTCCTGACCACCGCCAAAGGACAAGAACGGTGGGAGGACCCCGGCAAGCTGTACAACGTGG
           K L K F L T T A K D K N R W E D P G K L Y H V
p28      .....AAGTTCCTGACCACCGCCAAAGGACAAGAACCGGTGGGAGGACCCCGGCAAGCTGTACAACGTGG
           K F L T T A K C K N R W E D P G K L Y H V

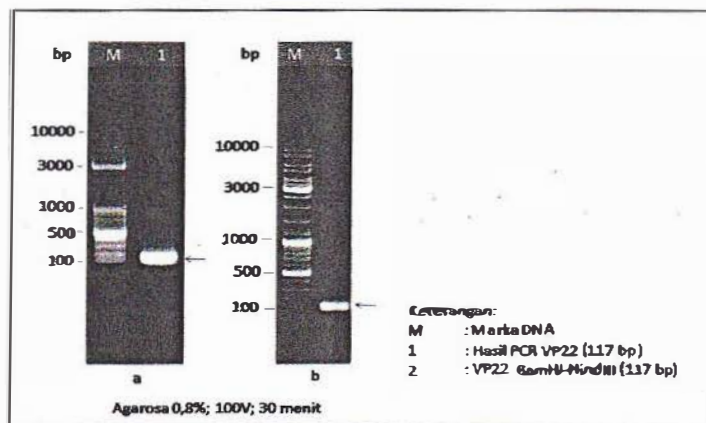
          20          30
P28(5)_CMVF AGGCCACCAAGCTACGCATAAGGATCC
           E A T S Y A + G S
p28      AGGCCACCAAGCTACGCATAAGGATCC
           E A T S Y A + G S

```

Gambar 20. Hasil alignment pcDNA3.1P28(5)

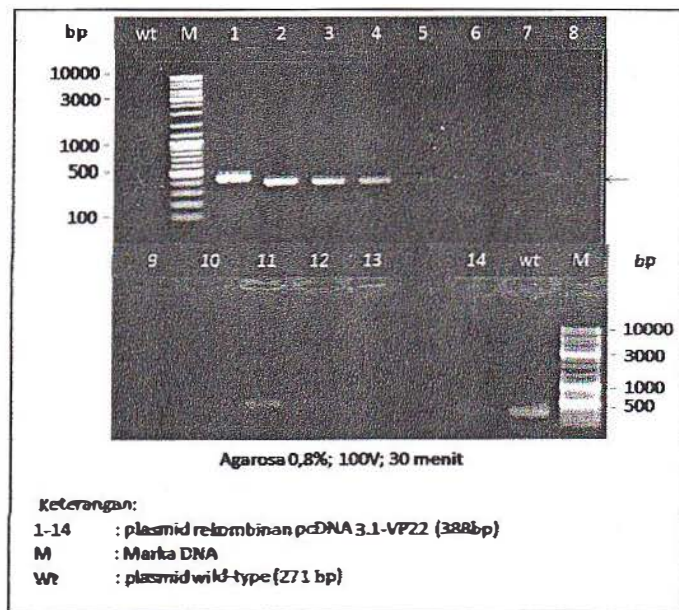
### V.10. Pengklonaan adjuvan gen VP22 ke dalam vektor plasmid pcDNA3.1(+)

DNA sisipan VP22 diamplifikasi dengan template gen sintetik VP22, DNA sisipan kemudian direstriksi dengan enzim restriksi *HindIII* dan *BamHI* (Gambar 21)

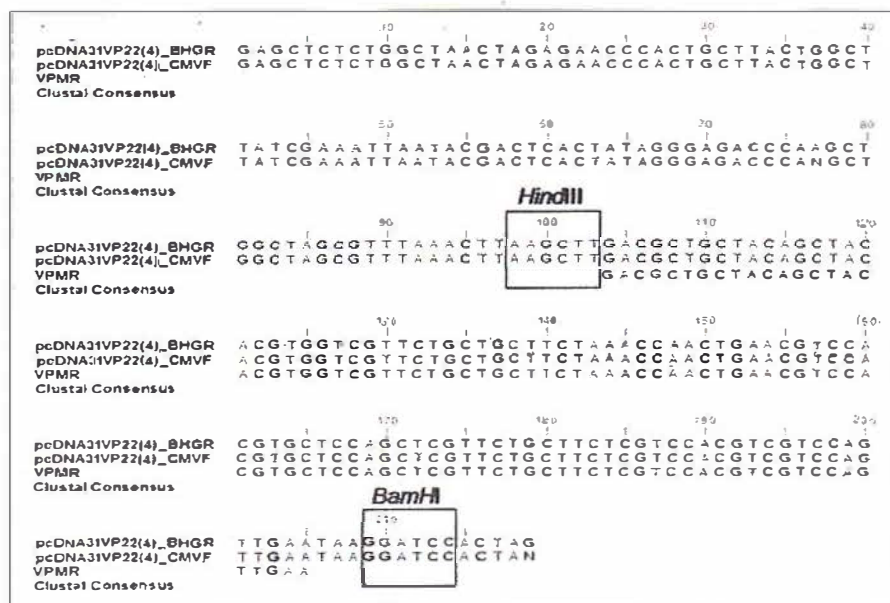


Gambar 21. DNA insert VP22 dan vektor pcDNA3.1(+)

Hasil ligasi dari DNA vektor dan sisipan VP22 kemudian diseleksi dengan PCR koloni menggunakan primer yang mengamplifikasi daerah Multiple Cloning Sites (MCS) dari vektor plasmid pcDNA3.1(+). Berdasarkan hasil seleksi PCR (Gambar 22), beberapa klon yang diperkirakan positif mengandung DNA sisipan VP22 kemudian diverifikasi sekuensing (Gambar 23).



Gambar 22. Hasil PCR sekuensing klon plasmid pcDNA3.1-VP22



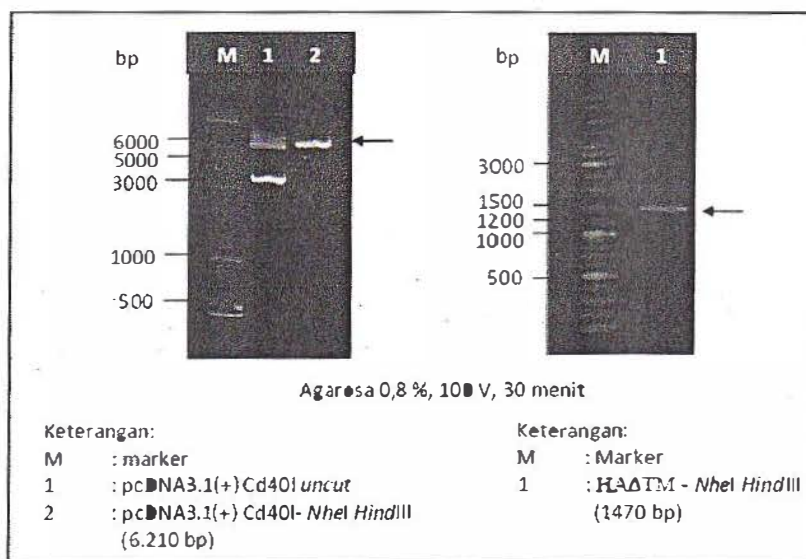
Gambar 23. Hasil sekuensing pcDNA3.1-VP22(4)

### 5.7. Pengklonaan gen HA-H5N1 tanpa daerah transmembran dan *cytotoxic tail* ke dalam vektor plasmid pcDNA3.1(+)-VP22 dan pcDNA3.1(+)-Cd401

Tahap selanjutnya setelah semua gen berhasil diklona ke dalam plasmid pcDNA3.1(+) adalah pembuatan vektor untuk fusi gen hemaglutinin dan adjuvan gen. Gen HAΔ<sup>TM</sup> diklona

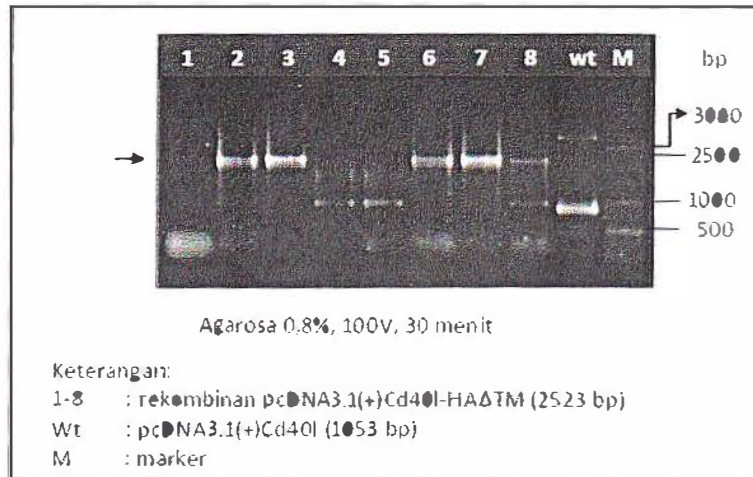
ke dalam vektor yang telah mengandung adjuvan gen, yaitu adjuvan gen CD40L, VP22, dan P28.

DNA insert HA $\Delta$ TM diamplifikasi menggunakan enzim *TaqHifi polymerase*, kemudian diklona ke dalam pcDNA 3.1(+)-CD40L. Fragmen HA $\Delta$ TM hasil PCR dipurifikasi, kemudian direstriksi menggunakan enzim *NheI* dan *HindIII* secara sekuensial. pcDNA3.1(+) yang telah mengandung fragmen CD40L digunakan sebagai vektor juga direstriksi dengan enzim yang sama. Gambar 24 merupakan visualisasi hasil restriksi fragmen HA $\Delta$ TM dan pcDNA3.1 CD40L



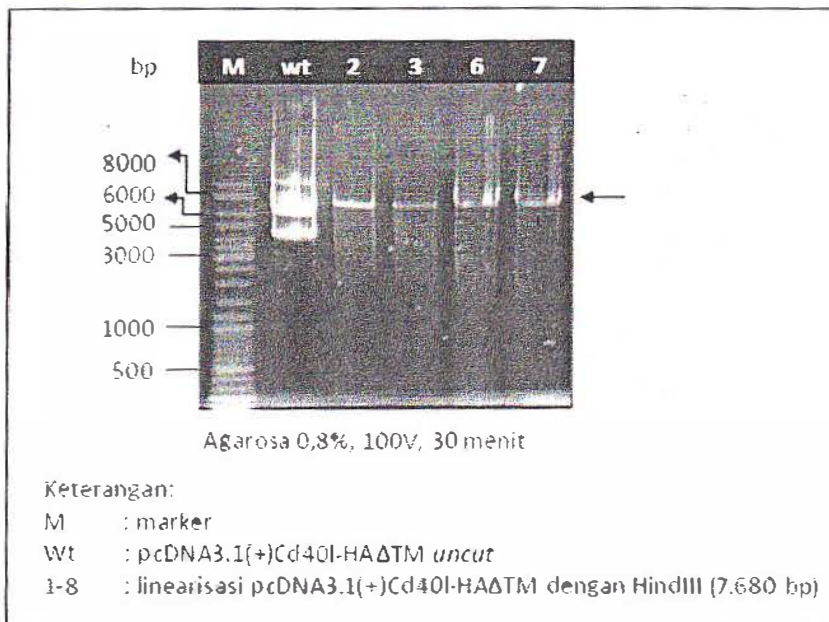
Gambar 24. Restriksi DNA insert HA $\Delta$ TM dan vektor pcDNA3.1 CD40L dengan enzim *NheI* dan *HindIII*

Hasil digesti fragmen HA $\Delta$ TM dan pcDNA.1 CD40L dipurifikasi dengan *low melting agarose*, selanjutnya diligasi menggunakan enzim *T4 DNA ligase*. Campuran reaksi ligasi diinkubasi 16°C selama 16 jam. Kontrol ligasi yang digunakan yaitu campuran ligasi yang hanya berisi vektor terlinearisasi, tanpa diberi DNA insert. Hasil ligasi selanjutnya ditransformasi ke dalam sel kompeten *Escherichia coli* TOP10 dengan metode *heat shock*. Hasil koloni yang tumbuh diverifikasi dengan PCR koloni dan dibuat replika koloni. Gambar 25 merupakan visualisasi hasil PCR koloni pada agarosa 0,8%. Berdasarkan hasil PCR koloni, terdapat 4 koloni dari total 8 koloni yang diverifikasi, mengindikasikan membawa fragmen HA $\Delta$ TM yaitu koloni no. 2,3,6, dan 7.



Gambar 25. PCR koloni plasmid rekombinan pcDNA3.1 CD40L HAΔTM

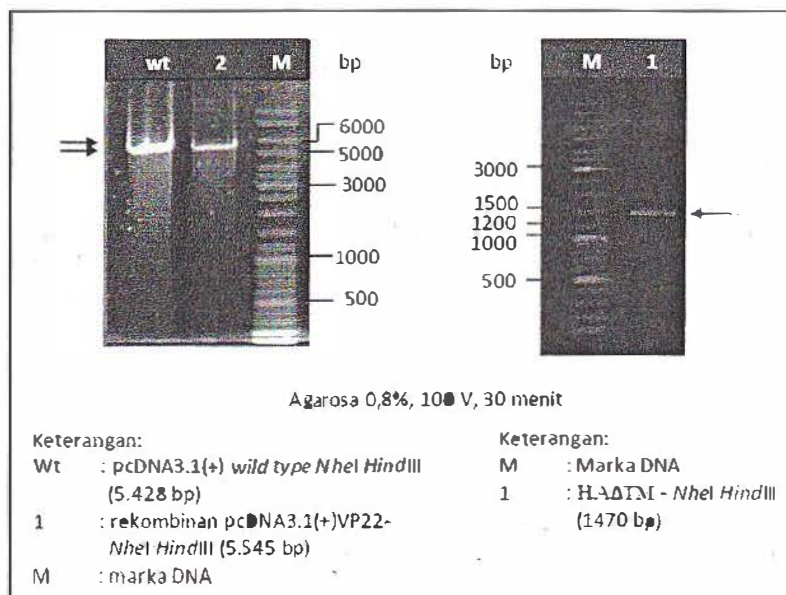
Koloni yang menunjukkan hasil positif pada PCR koloni kemudian diverifikasi kembali dengan teknik digesti. Plasmid rekombinan dilinearisasi menggunakan enzim *Hind*III untuk memastikan ukuran plasmid rekombinan. Gambar 18 menunjukkan hasil visualisasi verifikasi digesti plasmid rekombinan pada gel agarosa 0,8%. Hasil linearisasi plasmid rekombinan pcDNA3.1(+)-Cd40l HAΔTM koloni 2,3,6, dan 7 menunjukkan pola migrasi antara marka DNA 6.000 dan 7.000 bp. Sesuai dengan yang diharapkan yaitu berukuran 7.680 bp, gabungan antara pcDNA3.1 CD40L (6.210 bp) dan HAΔTM (1.470 bp).



Gambar 26. Linearisasi rekombinan pcDNA 3.1 CD40L HAΔTM dengan enzim *Hind*III

Analisis urutan basa nukleotida plasmid rekombinan pcDNA 3.1 CD40L HAΔTM dilakukan dengan metode sekuensing. Plasmid rekombinan pcDNA 3. CD40L HAΔTM no 2, 3, dan 7 disekuensing dengan primer CMVF. Hasil pensejajaran sebagian hasil sekuensing menunjukkan bahwa gen HAΔTM telah berhasil diklona ke dalam plasmid pcDNA3.1(+)-Cd40l.

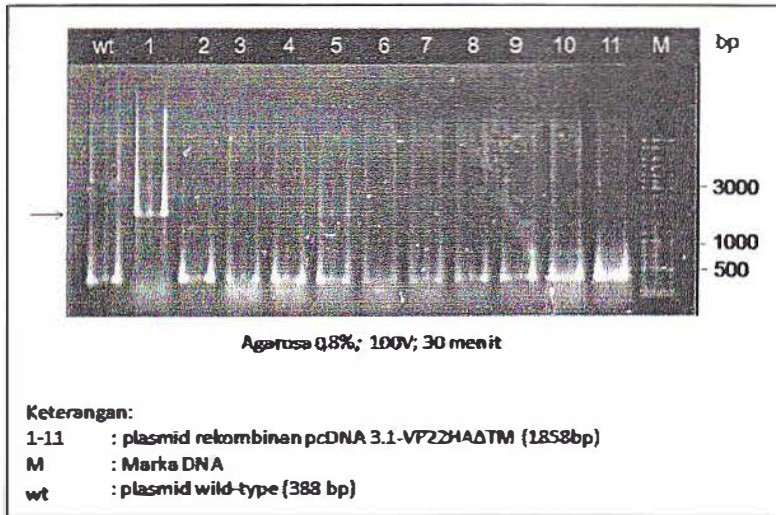
Plasmid pcDNA3.1 VP22 dan gen HAΔTM hasil amplifikasi PCR direstriksi menggunakan enzim restriksi *NheI* dan *HindIII*. Gambar 27 merupakan visualisasi gel agarosa 0,8% hasil restriksi DNA insert HAΔTM dan vektor pcDNA3.1 VP22 menggunakan enzim *NheI* dan *HindIII*.



Gambar 27. Restriksi fragmen HAΔTM dan vektor pcDNA3.1VP22 menggunakan enzim *NheI* dan *HindIII*

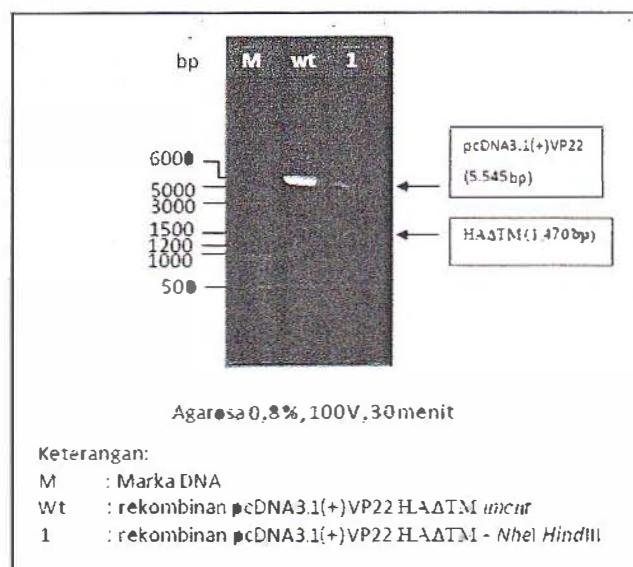
Hasil digesti fragmen HAΔTM dan pcDNA.1 VP22 dipurifikasi dengan *low melting agarose*, selanjutnya diligasi menggunakan enzim *T4 DNA ligase*. Campuran reaksi ligasi diinkubasi 16°C selama 16 jam. Kontrol ligasi yang digunakan yaitu campuran ligasi yang hanya berisi vektor terlinearisasi, tanpa diberi DNA insert. Hasil ligasi selanjutnya ditransformasi ke dalam sel kompeten *Escherichia coli* TOP10 dengan metode *heat shock*. Hasil koloni yang tumbuh diverifikasi dengan PCR koloni dan dibuat replika koloni. Gambar 28 merupakan visualisasi hasil PCR koloni pada agarosa 0,8%. Seleksi PCR koloni terhadap

11 klon plasmid pcDNA3.1VP22-HAΔTM menunjukkan hanya terdapat 1 klon yang diduga mengandung sisipan gen HAΔTM.



Gambar 28. PCR koloni pcDNA3.1 VP22 HAΔTM

Kloni 1 yang menunjukkan hasil positif pada PCR koloni kemudian diverifikasi kembali dengan teknik digesti menggunakan enzim *NheI* dan *HindIII*. Keberadaan DNA insert HAΔTM diketahui dari hasil digesti, yaitu hasil digesti menunjukkan terbentuknya 2 pita spesifik yang berukuran 5.545 bp yang merupakan vektor pcDNA3.1 VP22 dan pita berukuran 1.470 bp yang merupakan fragmen HAΔTM (Gambar 29).



Gambar 29. Verifikasi digesti rekombinan pcDNA3.1 VP22 HAΔTM

Analisis urutan basa nukleotida plasmid rekombinan pcDNA 3.1 VP22 HA $\Delta$ TM dilakukan dengan metode sekuensing. Hasil pensejajaran menunjukkan bahwa fragmen HA $\Delta$ TM telah berhasil diklona ke dalam plasmid pcDNA3.1 VP22.

## 6. KESIMPULAN

1. Telah didapatkan klon plasmid pcDNA3.1 P28
2. Telah didapatkan klon plasmid pcDNA3.1 HA $\Delta$ CTM
3. Telah didapatkan klon plasmid pcDNA3.1 Cd401
4. Telah didapatkan klon plasmid pcDNA3.1 VP22
5. Telah didapatkan klon plasmid pcDNA3.1 Cd401-HA $\Delta$ CTM
6. Telah didapatkan klon plasmid pcDNA3.1 VP22-HA $\Delta$ CTM

## 7. TARGET PENCAPAIAN TAHUNI

1. Diperoleh prediksi struktur sekunder dan tersier protein fusi
2. Diperoleh konstruksi dan ekspresi vaksin DNA, 56
3. Diperoleh konstruksi vektor dan ekspresi antigen rekombinan virus pada sistem ekspresi prokariota
4. Diperoleh konstruksi vektor dan ekspresi VLP pada sistem ekspresi baculovirus

PERSETUJUAN ATASAN

Jakarta, 01 Februari 2013

MENYETUJUI :

Kepala Bidang Biomedis



dr. Roselinda, M. Epid

NIP. 19580701 1987012001

Ketua Pelaksana



Dr.dr. Budiman Bela, Sp.MK(K)

NIP. 19650409 199203 1 002

DISETUJUI,

Ketua Panitia Pembina Ilmiah



Dr.drg. Magdarina D.A,MSc

NIP 195012061984022001



Dr.s. Ondri Dwi Sampurno, MSi, Apt

NIP 19621119 198803 1 001