

RAHASIA

LAPORAN AKHIR PENELITIAN

**Pengembangan Vaksin Dengue Tetravalen Sub Unit Protein
Rekombinan prM/E Strain Indonesia, Tahun ke-2 (TH 2016)**

Whinie Lestari & Tim

**PUSAT BIOMEDIS DAN TEKNOLOGI DASAR KESEHATAN
BADAN PENELITIAN DAN PENGEMBANGAN KESEHATAN
KEMENTERIAN KESEHATAN RI
JAKARTA
2016**

SK PENELITIAN



KEMENTERIAN KESEHATAN RI BADAN PENELITIAN DAN PENGEMBANGAN KESEHATAN

Jl. Percetakan Negara No. 23 Jakarta 10560 Indonesia Kotak Pos 1226
Telepon: (021) 42881758, 42881763, 42881762, 42881745, Faksimile: (021) 42881754
Website: www.pusat1.litbang.depkes.go.id, E-mail: ppid-pusat1@litbang.depkes.go.id

KEPUTUSAN

KEPALA PUSAT PENELITIAN DAN PENGEMBANGAN BIOMEDIS DAN TEKNOLOGI DASAR KESEHATAN
NOMOR: HK.02.04/II/1469/2016

TENTANG

PEMBENTUKAN TIM PELAKSANA PENELITIAN TAHUN 2016

PENGEMBANGAN VAKSIN DENGUE TETRAVALEN SUB UNIT PROTEIN REKOMBINAN prM/E STRAIN
INDONESIA, TAHUN KE-2 (TH 2016)

KEPALA PUSAT BIOMEDIS DAN TEKNOLOGI DASAR KESEHATAN

MENIMBANG

- a. Bahwa untuk melaksanakan kegiatan penelitian pada Pusat Penelitian dan Pengembangan Biomedis dan Teknologi Dasar Kesehatan (Puslitbang Biomedis dan Teknologi Dasar Kesehatan) Tahun 2016, perlu ditunjuk Tim Pelaksana Penelitian Tahun 2016;
- b. bahwa untuk "mengembangkan vaksin dengue teravalen subunit protein rekombinan prM/E DENV-1,-2,-3,-4 dengan sistem dan produk halal serta menghasilkan respon imun optimal menggunakan isolat Indonesia";
- c. bahwa sehubungan dengan pertimbangan huruf a dan b tersebut, maka dipandang perlu menetapkan Keputusan Kepala Puslitbang Biomedis dan Teknologi Dasar Kesehatan tentang Pembentukan Susunan Tim pelaksana penelitian **Pengembangan Vaksin Dengue Tetraвален Sub Unit Protein Rekombinan prM/E Strain Indonesia, Tahun ke-2 (Th. 2016), tahun 2016.**

MENGINGAT

1. Undang-Undang Nomor 18 Tahun 2001 tentang Sistem Nasional Penelitian, Pengembangan, dan Penerapan Ilmu Pengetahuan Teknologi (Lembaga Negara Republik Indonesia Tahun 2002 Nomor 84, Tambahan Lembaran Negara Republik Indonesia Nomor 4219);
2. Undang-undang Nomor 36 Tahun 2009 tentang Kesehatan (Lembara Negara Republik Indonesia Tahun 209 Nomor 144, Tambahan Lembaran Negara Republik Indonesia Nomor 5063);
3. Peraturan Pemerintah Nomor 39 Tahun 1995 tentang Penelitian dan Pengembangan Kesehatan (Lembaran Negara Tahun 1995 Nomor 67, Tambahan Lembaran Negara Republik Indonesia Nomor 3609);
4. Peraturan Pemerintah Nomor 20 Tahun 2005 tentang Alih Tehnologi Kekayaan Intelektual serta Hasil Penelitian dan Lembaga Penelitian dan Pengembangan (Lembaran Negara Republik Indonesia Tahun 2005 Nomor 43, Tambahan Lembaran Negara Nomor 4497);
5. Peraturan Menteri Kesehatan Nomor 64/Menkes/PER/IX/2015 tentang Organisasi dan Tata Kerja Kementerian Kesehatan;
6. Keputusan Menteri Kesehatan Nomor 791/Menkes/SK/VII/ 1999 tentang Kebijakan Nasional Penelitian dan Pengembangan Kesehatan;
7. Keputusan Menteri Kesehatan Nomor 1179A/Menkes/SK/X/ 1999 tentang Kebijakan Nasional Penelitian dan Pengembangan Kesehatan;

MEMPERHATIKAN

1. Daftar Isian Pelaksanaan Anggaran (DIPA) Puslitbang Biomedis dan Teknologi Dasar Kesehatan tahun 2016 dengan No. SP DIPA-024.11.1.416160/2016, tanggal 7 Desember 2015;
2. Surat Perjanjian Pelaksanaan Penelitian (SP3) Nomor: HK.02.04/II/1456/2016, tanggal 1 Februari 2016.



KEMENTERIAN KESEHATAN RI
BADAN PENELITIAN DAN PENGEMBANGAN KESEHATAN

Jl. Percetakan Negara No. 23 Jakarta 10560 Indonesia Kotak Pos 1226
Telepon: (021) 42881758, 42881763, 42881762, 42881745, Faksimile: (021) 42881754
Website: www.pusat1.litbang.depkes.go.id, E-mail: ppid-pusat1@litbang.depkes.go.id

MEMUTUSKAN

- MENETAPKAN** : KEPUTUSAN KEPALA PUSLITBANG BIOMEDIS DAN TEKNOLOGI DASAR KESEHATAN TENTANG PEMBENTUKAN TIM PELAKSANAAN PENELITIAN **PENGEMBANGAN VAKSIN DENGUE TETRAVALEN SUB UNIT PROTEIN REKOMBINAN PRM/E STRAIN INDONESIA, TAHUN KE-2 (TH. 2016);**
- KESATU** : Susunan dan tugas Tim Pelaksana Penelitian **Pengembangan Vaksin Dengue Tetravalen Sub Unit Protein Rekombinan prM/E Strain Indonesia, Tahun ke-2(Th. 2016)**, tercantum dalam lampiran yang merupakan bagian tidak terpisahkan dari keputusan ini;
- KEDUA** : Dalam melaksanakan tugasnya, Tim bertanggungjawab kepada Kepala Puslitbang Biomedis dan Teknologi Dasar Kesehatan serta wajib menyampaikan laporan akhir penelitian sebagai pertanggung-jawaban kegiatan;
- KETIGA** : Biaya pelaksanaan kegiatan Tim Pelaksana Penelitian Tahun 2016 dibebankan pada anggaran DIPA Puslitbang Biomedis dan Teknologi Dasar Kesehatan Tahun 2016;
- KEEMPAT** : Keputusan ini mulai berlaku untuk tahun anggaran 2016.

Ditetapkan di : Jakarta

Pada tanggal : 1 Februari 2016

Kepala Pusat Biomedis dan Teknologi Dasar Kesehatan,

Pretty Multihartina, Ph.D
NIP. 19630927 198901 2 001

Tembusan Yth:

1. Sekretaris Jenderal Kemenkes RI;
2. Inspektur Jenderal Kemenkes RI
3. Ketua Badan Pemeriksa Keuangan;
4. Kepala Badan Pengawasan Keuangan dan Pembangunan;
5. Kepala Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan;
6. Sekretaris Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan;
7. Kanwil Ditjen Anggaran Kemenkeu RI DKI Jakarta;
8. Para Kepala Pusat di Lingkungan Badan Litbang Kesehatan;
9. Kepala Bagian Tata Usaha Puslitbang Biomedis dan Teknologi Dasar Kesehatan;
10. Kepala Bidang Biomedis, Puslitbang Biomedis dan Teknologi Dasar Kesehatan;
11. Kepala Bidang Teknologi Dasar Kesehatan, Puslitbang Biomedis dan Teknologi Dasar Kesehatan;
12. Bendaharawan Pengeluaran Puslitbang Biomedis dan Teknologi Dasar Kesehatan;
13. Masing-masing yang bersangkutan untuk dilaksanakan.



KEMENTERIAN KESEHATAN RI
BADAN PENELITIAN DAN PENGEMBANGAN KESEHATAN

Jl. Percetakan Negara No. 23 Jakarta 10560 Indonesia Kotak Pos 1226
Telepon: (021) 42881758, 42881763, 42881762, 42881745, Faksimile: (021) 42881754
Website: www.pusat1.litbang.depkes.go.id, E-mail: ppid-pusat1@litbang.depkes.go.id

Lampiran 1

Keputusan Kepala Pusat Biomedis dan Teknologi Dasar Kesehatan

Nomor : HK.02.04/II/1469/2016

Tanggal : 1 Februari 2016

SUSUNAN TIM PELAKSANA PENELITIAN TAHUN 2016

PENGEMBANGAN VAKSIN DENGUE TETRAVALEN SUB UNIT PROTEIN REKOMBINAN prM/E STRAIN INDONESIA, TAHUN KE-2 (TH 2016)

No.	Nama	Kedudukan dalam Tim	Uraian Tugas
I. PUSLITBANG BIOMEDIS DAN TEKNOLOGI DASAR KESEHATAN, BALITBANGKES			
1.	Dr. dr. C.S. Whinie Lestari, M.Kes	Ketua Pelaksana/Peneliti Muda	Bertanggung jawab atas seluruh kegiatan penelitian
2.	Pretty Multihartina, Ph.D	Pengarah	Pengarah Konsorsium Riset Vaksin Dengue
3.	drh. Rita Marleta Dewi, M.Kes	Peneliti Madya	Bertanggung jawab untuk memfasilitasi koordinasi seluruh pertemuan di konsorsium riset vaksin dengue
4.	dr. Masri Sembiring Maha, DTMH, MCTM	Peneliti Muda	Membantu koordinasi seluruh pertemuan di konsorsium riset vaksin dengue
5.	Teti Fitriani, Amd.	Pembantu Peneliti	Bertanggung jawab melakukan transformasi plasmid rekombinan prM/E DENV-1 genotipe 1 ke Pichia pastoris dan purifikasi protein rekombinan
6.	Anisa Yunita, AMAK	Pembantu Peneliti	Bertanggung jawab melakukan penyiapan isolat DENV-1,-2,-3,-4 strain Indonesia untuk bahan kandidat vaksin dan pengujian dan optimasi ekspresi protein rekombinan
7.	Iqbal Al Mukhlisin, S.Si	Pembantu Peneliti	Membantu penyiapan isolat DENV-1,-2,-3,-4, verifikasi transformant dan penentuan fenotif transformant
8.	Fitria, S.Si	Pembantu Peneliti	Melakukan optimasi purifikasi protein rekombinan
9.	Siti Mariyani AMAK	Pembantu Peneliti	Membantu melakukan verifikasi transformant dan penentuan fenotif transformant.
10.	Elita Tyfani, A.Md	Pembantu Peneliti	Bertanggung jawab atas dokumentasi dan administrasi kesekretariatan seluruh institusi di konsorsium vaksin dengue.
11.	Hamrah Sri Wuryani	Pembantu Peneliti	Bertanggung jawab atas administrasi keuangan penelitian di konsorsium vaksin dengue
12.	Budi Rahayu	Pembantu Peneliti	Bertanggung jawab atas administrasi keuangan di konsorsium vaksin dengue
II. LEMBAGA EIJKMAN			
1.	R. Tedjo Sasmono, Ph.D	Ketua Tim di Lembaga Eijkman (Pembantu Peneliti)	Mengkoordinasi, mendesain penelitian, menganalisa data penelitian, melaporkan hasil penelitian
2.	Benediktus Yohan, S.Farm., M.Biomed	Pembantu Peneliti	Melakukan melakukan transformasi plasmid rekombinan prM/E DENV-4 dan purifikasi protein rekombinan



KEMENTERIAN KESEHATAN RI

BADAN PENELITIAN DAN PENGEMBANGAN KESEHATAN

Jl. Percetakan Negara No. 23 Jakarta 10560 Indonesia Kotak Pos 1226
Telepon: (021) 42881758, 42881763, 42881762, 42881745, Faksimile: (021) 42881754
Website: www.pusat1.litbang.depkes.go.id, E-mail: ppid-pusat1@litbang.depkes.go.id

No.	Nama	Kedudukan dalam Tim	Uraian Tugas
3.	Denis. S.Si	Pembantu Peneliti	Melakukan melakukan optimasi ekspresi protein rekombinan.
4.	Rahma Fitri Hayati, B.Sc., M.Sc	Pembantu Peneliti	Melakukan melakukan verifikasi transformant dan penentuan fenotif transformant.
5.	Hidayat Trimarsanto, B.Sc	Pembantu Peneliti	Membantu melakukan verifikasi transformant dan penentuan fenotif transformant.
III. FAKULTAS KEDOKTERAN UNIVERSITAS INDONESIA			
1.	Beti Ernawati Dewi, Ph.D	Ketua Tim di Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia (Pembantu Peneliti)	Mengkoordinasi, mendesain penelitian, menganalisa data penelitian, melaporkan hasil untuk sistem ekspresi metode alternatif
2.	dr. Tjahjani Mirawati Sudiro, Ph.D	Wakil Ketua Tim di Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia (Pembantu Peneliti)	Mengkoordinasi, mendesain penelitian, menganalisa data penelitian, melaporkan hasil untuk sistem ekspresi Pichia pastoris
3.	Fithriyah S.Si, M.Biomed, PhD	Pembantu Peneliti	Melakukan purifikasi protein rekombinan
4.	Hidayati Desti	Pembantu Peneliti	Melakukan melakukan transformasi plasmid rekombinan pM/E DENV-2 dan optimasi ekspresi protein rekombinan
5.	Andi Aisyiah Alwie	Pembantu Peneliti	Melakukan melakukan verifikasi transformant dan penentuan fenotif transformant.
6.	Lola Febriana Dewi, S.Si	Pembantu Peneliti	Membantu melakukan purifikasi protein rekombinan
IV. FAKULTAS KEDOKTERAN UNIVERSITAS GADJAH MADA			
1.	dr. Tri Wibawa, Ph.D, SpMK	Ketua Tim di Fakultas Kedokteran Universitas Gadjah Mada (Pembantu Peneliti)	Mengkoordinasi, mendesain penelitian, menganalisa data penelitian, melaporkan hasil penelitian
2.	Dr. Nastiti Wijayanti, M.Si	Pembantu Peneliti	Melakukan melakukan transformasi plasmid rekombinan pM/E DENV-1 genotipe IV dan purifikasi protein rekombinan
3.	Lisna Hidayati, M.Biotech	Pembantu Peneliti	Melakukan melakukan optimasi ekspresi protein rekombinan.
4.	Linda Oktabriana	Pembantu Peneliti	Membantu melakukan verifikasi transformant dan penentuan fenotif transformant.
5.	Alifah Mubarakah	Pembantu Peneliti	Melakukan melakukan verifikasi transformant dan penentuan fenotif transformant.
V. PUSAT TEKNOLOGI FARMASI DAN MEDIKA – BPPT			
1.	Fifit Juniarti, BSc (hons)	Ketua Tim di Pusat Teknologi Farmasi dan Medika – BPPT (Perekayasa Pertama)	Mengkoordinasi, mendesain penelitian, menganalisa data penelitian, melaporkan hasil penelitian
2.	Sabar Pambudi, Ph.D	Perekayasa Muda	Melakukan melakukan transformasi plasmid rekombinan pM/E DENV-3 dan purifikasi protein rekombinan

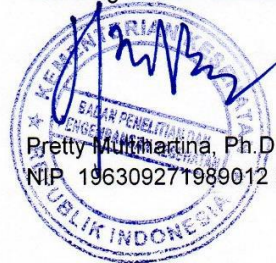


KEMENTERIAN KESEHATAN RI
BADAN PENELITIAN DAN PENGEMBANGAN KESEHATAN

Jl. Percetakan Negara No. 23 Jakarta 10560 Indonesia Kotak Pos 1226
Telepon: (021) 42881758, 42881763, 42881762, 42881745, Faksimile: (021) 42881754
Website: www.pusat1.litbang.depkes.go.id, E-mail: ppid-pusat1@litbang.depkes.go.id

No.	Nama	Kedudukan dalam Tim	Uraian Tugas
3.	Dodi Irawan, S.Si	Perekayasa Pertama	Melakukan melakukan optimasi ekspresi protein rekombinan.
4.	Drs. Subintoro	Perekayasa Muda	Membantu melakukan verifikasi transformant dan penentuan fenotif transformant.
5.	Asri Sulianti, M.Biomed	Perekayasa Pertama	Melakukan melakukan verifikasi transformant dan penentuan fenotif transformant.

Kepala Pusat Penelitian dan Pengembangan Biomedis dan
Teknologi Dasar Kesehatan,



Pretty Murtina, Ph.D
NIP. 196309271989012 001

SUSUNAN TIM PENELITI

PUSAT BIOMEDIS DAN TEKNOLOGI DASAR KESEHATAN, BALITBANGKES

No.	Nama	Kedudukan dalam Tim	Uraian Tugas
1.	Dr. dr. C. S. Whinie Lestari M.Kes	Ketua Pelaksana/ Peneliti Muda	Bertanggung jawab atas seluruh kegiatan penelitian
2.	Pretty Multihartina, Ph.D	Pengarah	Pengarah Konsorsium Riset Vaksin Dengue
3.	Drh. Rita Marleta, M.Kes	Peneliti Madya	Bertanggung jawab untuk memfasilitasi koordinasi seluruh pertemuan di konsorsium riset vaksin dengue
4.	dr. Masri Sembiring Maha, DTMH, MCTM	Peneliti Muda	Membantu koordinasi seluruh pertemuan di konsorsium riset vaksin dengue
5.	Teti Fitriani, Amd.	Pembantu Peneliti	Bertanggungjawab membantu ekspresi protein rekombinan.
6.	Anisa Yunita, AMAK	Pembantu Peneliti	Bertanggung jawab melakukan penyiapan isolat DENV-1,-2,-3,-4 strain Indonesia untuk bahan kandidat vaksin dan pengujian
7.	Ady Septianto Hermawan, S.Si.	Pembantu Peneliti	Membantu penyiapan isolat DENV-1,-2,-3,-4
8.	Fitria, S.Si	Pembantu Peneliti	Melakukan verifikasi transformant dan penentuan fenotif transformant.
9.	Siti Mariyani AMAK	Pembantu Peneliti	Membantu melakukan verifikasi transformant dan penentuan fenotif transformant.
10.	Elita Tyfani, A.Md	Pembantu Peneliti	Bertanggung jawab atas dokumentasi dan administrasi kesekretariatan seluruh institusi di konsorsium vaksin dengue.
11.	Hambrah Sri Wuryani	Pembantu Peneliti	Bertanggung jawab atas administrasi keuangan penelitian di konsorsium vaksin dengue
12.	Budi Rahayu	Pembantu Peneliti	Bertanggung jawab atas administrasi keuangan di konsorsium vaksin dengue

LEMBAGA EIJKMAN

No.	Nama	Kedudukan dalam Tim	Uraian Tugas
1	R. Tedjo Sasmono, Ph.D	Ketua Tim di Lembaga Eijkman (Pembantu Peneliti)	Mengkoordinasi, mendesain penelitian, menganalisa data penelitian, melaporkan hasil penelitian
2	Benediktus Yohan, S.Farm., M.Biomed	Pembantu Peneliti	Melakukan melakukan transformasi plasmid rekombinan prM/E DENV-4

			dan purifikasi protein rekombinan
3	Febrina Meutiawati, M.Si	Pembantu Peneliti	Melakukan melakukan optimasi ekspresi protein rekombinan.
4	Rahma Fitri Hayati, B.Sc., M.Sc	Pembantu Peneliti	Melakukan melakukan verifikasi transformant dan penentuan fenotif transformant.
5	Hidayat Trimarsanto, B.Sc	Pembantu Peneliti	Membantu melakukan verifikasi transformant dan penentuan fenotif transformant.

FAKULTAS KEDOKTERAN UNIVERSITAS INDONESIA

No.	Nama	Kedudukan dalam Tim	Uraian Tugas
1	Beti Ernawati Dewi, Ph.D	Ketua Tim di Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia (Pembantu Peneliti)	Mengkoordinasi, mendesain penelitian, menganalisa data penelitian, melaporkan hasil untuk sistem ekspresi metode alternatif
2	dr. T. Mirawati Sudiro, Ph.D	Wakil Ketua Tim di Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia (Pembantu Peneliti)	Mengkoordinasi, mendesain penelitian, menganalisa data penelitian, melaporkan hasil untuk sistem ekspresi Pichia pastoris
3	Fithriyah S.Si, M.Biomed, PhD	Pembantu Peneliti	Melakukan purifikasi protein rekombinan
4	Wahyu Hidayati M.Biomed	Pembantu Peneliti	Melakukan melakukan transformasi plasmid rekombinan prM/E DENV-2 dan optimasi ekspresi protein rekombinan
5	Atik Rahmawati, S.Si	Pembantu Peneliti	Melakukan melakukan verifikasi transformant dan penentuan fenotif transformant.
6	Lola Febrian Deni, S.Si	Pembantu Peneliti	Membantu melakukan purifikasi protein rekombinan

PUSAT TEKNOLOGI FARMASI DAN MEDIKA – BPPT

No	Nama	Kedudukan dalam Tim	Uraian Tugas
1.	Fifit Juniarti, BSc (hons)	Ketua Tim di Pusat Teknologi Farmasi dan Medika – BPPT (Perekayasa Pertama)	Mengkoordinasi, mendesain penelitian, menganalisa data penelitian, melaporkan hasil penelitian
2.	Sabar Pambudi, Ph.D	Perekayasa Muda	Melakukan melakukan transformasi plasmid rekombinan prM/E DENV-3 dan purifikasi protein rekombinan

3.	Dody Irawan, S.Si	Perekayasa Pertama	Melakukan melakukan optimasi ekspresi protein rekombinan.
4.	Drs. Subintoro	Perekayasa Muda	Membantu melakukan verifikasi transformant dan penentuan fenotif transformant.
5.	Asri Sulfianti, M.Biomed	Perekayasa Pertama	Melakukan melakukan verifikasi transformant dan penentuan fenotif transformant.

FAKULTAS KEDOKTERAN UNIVERSITAS GADJAH MADA

No.	Nama	Kedudukan dalam Tim	Uraian Tugas
1.	dr. Tri Wibawa, Ph.D, SpMK	Ketua Tim di Fakultas Kedokteran Universitas Gadjah Mada (Pembantu Peneliti)	Mengkoordinasi, mendesain penelitian, menganalisa data penelitian, melaporkan hasil penelitian
2.	Dr. Nastiti Wijayanti, M.Si	Pembantu Peneliti	Melakukan melakukan transformasi plasmid rekombinan prM/E DENV-1 genotipe IV dan purifikasi protein rekombinan
3.	Lisna Hidayati, M.Biotech	Pembantu Peneliti	Melakukan melakukan optimasi ekspresi protein rekombinan.
4.	Linda Oktabrina	Pembantu Peneliti	Membantu melakukan verifikasi transformant dan penentuan fenotif transformant.
5.	Alifah Mubarakah	Pembantu Peneliti	Melakukan melakukan verifikasi transformant dan penentuan fenotif transformant.

SURAT PERSETUJUAN ETIK



KEMENTERIAN KESEHATAN RI BADAN PENELITIAN DAN PENGEMBANGAN KESEHATAN

Jalan Percetakan Negara No. 29 Jakarta 10560 Kotak Pos 1226

Telepon : (021) 4261088 Faksimile : (021) 4243933

Surat Elektronik : sesban@litbang.depkes.go.id Laman (*Website*) : <http://www.litbang.depkes.go.id>

PEMBEBASAN PERSETUJUAN ETIK (*EXEMPTED*)

Nomor : LB.02.01/5.2/KE.280/2016

Yang bertanda tangan di bawah ini, Ketua Komisi Etik Penelitian Kesehatan Badan Litbang Kesehatan, setelah dilaksanakan pembahasan dan penilaian berdasarkan *Nuremberg Code* dan Deklarasi Hensinki, dengan ini memutuskan protokol penelitian yang berjudul :

"Pengembangan Vaksin Dengue Tetravalen Sub Unit Protein Rekombinan prM/E Strain Indonesia Tahun Ke-2 (Tahun 2016)"

dengan Ketua Pelaksana/Peneliti Utama: **Dr. dr. Cristina Safira Whinie Lestari, M.Kes.**

dapat dibebaskan dari keharusan memperoleh persetujuan etik (*Exempted*) untuk pelaksanaan penelitian tersebut. Pembebasan ini berlaku sejak dimulai dilaksanakannya penelitian tersebut di atas sampai dengan selesai sesuai yang tercantum dalam protokol dengan masa berlaku maksimum selama 1 (satu) tahun.

Walaupun demikian kami mengingatkan bahwa dalam pelaksanaan penelitian ini, peneliti tetap diminta untuk menjaga dan menghormati martabat manusia yang menjadi responden/informan dalam penelitian ini. Dengan demikian diharapkan masyarakat luas dapat memperoleh manfaat yang baik dari penelitian ini.

Selama penelitian berlangsung, laporan kemajuan (setelah 50% penelitian terlaksana), laporan *Serious Adverse Event/SAE* (bila ada) harus diserahkan kepada KEPK-BPPK. Pada akhir penelitian, laporan pelaksanaan penelitian harus diserahkan kepada KEPK-BPPK. Jika ada perubahan protokol dan/atau perpanjangan penelitian, harus mengajukan kembali permohonan kajian etik penelitian (amandemen protokol).

Jakarta, 10 Mei 2016

Ketua
Komisi Etik Penelitian Kesehatan
Badan Litbang Kesehatan,

Prof. Dr. M. Sudomo

PERSETUJUAN ATASAN

Jakarta, Desember 2016

DISETUJUI

Kepala Bidang Biomedis

Drh. Rita Marleta Dewi, M.Kes
NIP. 195912111985032001

Ketua Panitia Pembina Ilmiah

Dra. Sarwo Handayani, M.Sc
NIP. 196606251991032001

Ketua Pelaksana



Dr. dr. C.S. Whinie Lestari, M.Kes
NIP. 196912061999032001

Kepala Puslitbang Biomedis dan
Teknologi Dasar Kesehatan

Dra. Pretty Multihartina, PhD
NIP. 196309271989012001

KATA PENGANTAR

Pembentukan Konsorsium riset vaksin pada acara “Harmonisasi Riset Vaksin Indonesia dalam Menyongsong Dekade Vaksin 2011-2020” merupakan cikal bakal upaya untuk menghasilkan produk vaksin dalam negeri. Balitbangkes bekerjasama dengan Kemenristek telah memprakarsai pertemuan penyusunan Roadmap Vaksin Dengue yang melibatkan akademisi, industri dan lembaga penelitian. Naskah Roadmap Penelitian dan Pengembangan Vaksin Dengue 2012-2020 telah disusun dan dikembangkan oleh kelompok kerja riset vaksin Dengue yang terdiri dari perwakilan institusi Kementerian Kesehatan - Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan, Universitas Indonesia, Universitas Gadjah Mada, Lembaga Eijkman, Badan Pengkajian dan Penerapan Teknologi, Pusat Studi Satwa Primata IPB dan PT Bio Farma. Selanjutnya naskah road map ini dituangkan dalam bentuk penelitian bersama dengan seluruh institusi penelitian yang terlibat dengan bersinergi sehingga tidak terjadi duplikasi penelitian.

Penelitian pengembangan vaksin dengue dalam bentuk konsorsium dimulai sejak tahun 2013. Namun pada tahun 2013-2014 adalah tahap eksplorasi dengan mengembangkan berbagai macam jenis vaksin yaitu vaksin DNA, vaksin protein rekombinan dan vaksin peptida. Sesuai hasil evaluasi industri vaksin Bio Farma dan seluruh tim konsorsium untuk percepatan kearah produk maka pada tahun 2015 dilakukan penelitian pengembangan vaksin dengan metode seragam. Penelitian berjudul “ Pengembangan Vaksin Dengue Tetravalen Sub Unit Protein Rekombinan prM/E Strain Indonesia, Tahun ke-2 (TH 2016) merupakan penelitian tahun kedua dengan metode dan jenis vaksin seragam dan diharapkan dapat dilanjutkan terus hingga diperoleh produk vaksin Dengue tetravalen yang berasal dari DENV-1,-2,-3,-4, strain Indonesia, aman dan halal yang dapat digunakan oleh industri vaksin. Metode untuk konstruksi dan produksi protein rekombinan dilakukan dengan 2 metode yaitu metode seragam yang dikembangkan di Bio Farma di sistem ekspresi *Pichia pastoris* dan alternatif metode lain yang sudah dikembangkan di institusi masing-masing. Kemajuan penelitian sampai bulan Desember, nampaknya masih perlu dilanjutkan karena terkendala dengan metode eksperimental yang perlu dioptimasi ulang serta keterbatasan reagensia karena efisiensi anggaran. Semoga hasil penelitian ini dapat bermanfaat hingga menjadi produk akhir vaksin yang dapat dimanfaatkan oleh industri.

Jakarta, Desember 2016
Ketua Pelaksana



Dr. dr. C. S. Whinie Lestari, M.Kes

RINGKASAN EKSEKUTIF

Virus dengue (DENV) sampai saat ini masih menjadi masalah kesehatan masyarakat di dunia dan pemberantasan penyakit ini masih tertuju pada vektor dan lingkungan. Di Indonesia demam berdarah Dengue (DBD) menjadi salah satu program prioritas kesehatan sesuai dengan rencana strategis (renstra) Kementerian Kesehatan tahun 2010-2014. Hingga saat ini obat untuk DBD belum ada. Vaksinasi merupakan salah satu alternatif potensial dalam pencegahan DBD. DENV adalah penyebab *DF (dengue fever)*, *DHF (dengue haemorrhagic fever)* dan *DSS (dengue shock syndrom)* yang merupakan kolaborasi keempat serotipe (DENV-1,-2,-3,-4). Keempat serotipe tersebut beredar di Indonesia dengan genotipe yang berbeda dengan negara lain, sehingga untuk pengembangan vaksin dibutuhkan strain yang dapat mewakili Indonesia secara umum. Epitope predominan yang berperan penting dalam patogenesis adalah protein struktural (protein prM-E) dan protein nonstruktural (NS1 dan NS3). Protein prM dan E dapat menginduksi respon imun humoral dan selular sehingga protein tersebut yang akan dieksplorasi sebagai bahan imunogen untuk kandidat vaksin.

Sesuai dengan roadmap riset vaksin Dengue nasional, pada tahap 1 tahun 2013 telah diperoleh hasil karakterisasi biologi strain vaksin chimera (dilaksanakan Eijkman), vaksin chimera pada fusi gen (UNAIR), plasmid rekombinan prM-E, NS3 Dengue serotipe 1,2,3 dan 4 (Balitbangkes, UI, BPPT, UGM), desain epitop vaksin secara *in silico* (UAI), hasil sintesa adjuvant nanopartikel liposom (LIPI) dan analisis status viremia pada hewan coba satwa primata beruk (PSSP-IPB). Penelitian tahap 2 tahun 2014 telah diperoleh hasil: penentuan strain vaksin dengue tetravalent isolat Indonesia yang mewakili genotipe secara umum di Indonesia, protein rekombinan prM-E DENV-1, NS3 DENV-1,-2,-3 dan NS1 DENV-1 sebagai kandidat vaksin protein rekombinan (Balitbangkes, BPPT, UGM, Eijkman), optimasi vaksin DNA NS3 DENV-2 (UI), mendapatkan satwa primata indigeneus Indonesia (beruk/*M. nemestrina*) terstandar (PSSP-IPB) dan vaksin adjuvant berbasis nanopartikel liposom yang stabil dan aman (LIPI) serta desain vaksin peptida untuk MHC class I dan II (Biofarma).

Sesuai dengan tindak lanjut pertemuan konsorsium vaksin dengue dengan pihak industri (PT Biofarma) untuk percepatan produksi vaksin dengue, maka pada pertemuan tanggal 11 Maret 2015 telah disepakati keseragaman jenis vaksin dan metode pengembangannya. Pengembangan kandidat vaksin dengue dengan pertimbangan menggunakan seed yang halal (*porcine free*), virus dengue serotipe 1,2,3,4 dengan strain paling dominan yang mewakili Indonesia (strain yang relatif baru), keamanan (termasuk untuk lingkungan: tidak mengintroduksi varian virus baru di alam), sudah dikembangkan teknologinya oleh institusi dan industri vaksin Bio Farma dan kemudahan untuk regulasi.

Jenis vaksin seragam yang dikembangkan adalah vaksin subunit protein rekombinan prM/E tetraivalent (DENV-1,-2,-3,-4, strain Indonesia). Metode untuk konstruksi dan produksi protein rekombinan dilakukan dengan 2 metode yaitu metode yang sudah dikembangkan di institusi masing-masing dan metode yang dikembangkan di Bio Farma di sistem ekspresi *Pichia pastoris*. Sesuai masukan Bio Farma setelah workshop penyeragaman metode pada bulan September 2015, disarankan menggunakan vektor plasmid dengan sistem ekspresi ekstraseluler untuk memudahkan purifikasi protein rekombinan. Sehingga dilakukan perubahan vektor plasmid yang semula pAO815 menjadi pPICZ alpha dengan modifikasi penambahan stop kodon untuk menghindari residu asam amino lain yaitu *histidine* dan epitop c-myc dengan sistem ekspresi yang sama dengan Bio Farma yaitu sel *yeast Pichia pastoris*.

Pembagian area penelitian untuk pengembangan vaksin tetravalen (untuk keempat serotipe virus dengue) strain Indonesia terpilih di institusi sebagai berikut: PBTDK, Balitbangkes mengembangkan DENV-1 genotipe 1, FK UGM untuk DENV-1 genotipe IV, FK UI untuk DENV-2 genotipe cosmopolitan, BPPT untuk DENV-3 genotipe I, Lembaga Biomol Eijkman untuk DENV-4 genotipe I. Penelitian tahun 2015-2016 yang dilaksanakan di institusi PBTDK (yang merupakan bagian dari konsorsium riset vaksin dengue) telah diperoleh hasil kultur DENV-1,-2,-3,-4 strain kandidat vaksin. Penyiapan isolat DENV-1,-2,-3 dan DENV-4 strain kandidat vaksin digunakan sebagai bahan pengembangan vaksin dan bahan uji untuk seluruh institusi di konsorsium yang menggunakan isolat Indonesia seragam terpilih dari koleksi Balitbangkes tahun 2009 yang sudah mendapat persetujuan Komisi Etik. Untuk kandidat vaksin subunit protein rekombinan, telah diperoleh plasmid rekombinan prM/E DENV-1 genotipe I dan IV, prM/E DENV-2, DENV-3 dan DENV-4 yang telah diverifikasi dengan metode digesti, PCR dan sekuensing. Kemudian telah diperoleh juga hasil transformasi plasmid rekombinan ke sel inang *yeast P. pastoris* menjadi *P. pastoris* rekombinan prM/E DENV-1,-2,-3,-4 yang telah diverifikasi dengan metode PCR. Untuk *P. pastoris* rekombinan prM/E DENV-1 dan DENV-4 telah diverifikasi juga dengan metode sekuensing yang menunjukkan hasil gen pengkode protein rekombinan memiliki homologi (similaritas 100%) dengan sekuen protein aslinya dari *wild type* virus dengue strain Indonesia. Selanjutnya telah diperoleh juga protein rekombinan prM/E DENV-1 dan DENV-4 yang telah diverifikasi dengan metode SDS PAGE berukuran sekitar 56 kDa dan Western Blot yang menunjukkan bahwa protein rekombinan tersebut dapat mengenali antibody premembran dengue dan antibody prM/E DENV-1,-2,-3,-4 dan tetraivalent. Keterbatasan penelitian terkait metode eksperimental adalah belum diperoleh protein rekombinan prM/E DENV-2 dan -3 sehingga masih harus dilanjutkan ke proses ekspresi proteinnya. Selain itu

juga protein rekombinan prM/E DENV-1 dan DENV-4 yang sudah terverifikasi sebagai antigen yang dapat mengenali antibody juga perlu dilanjutkan ke tahap ekspresi yang semula skala flask kemudian upscale di Bio Farma menggunakan bioreactor sehingga seluruh parameter dapat terkontrol dan menjamin stabilitas produksinya. Keterbatasan reagensia karena efisiensi anggaran sehingga masih perlu dilanjutkan kultur virus dengue strain vaksin dan strain lainnya untuk mendapatkan titer yang tinggi serta untuk pengujian titer virus. Selain itu perlu dilanjutkan juga proses optimasi purifikasi protein rekombinan prM/E DENV-1 dan DENV-4. Proses penelitian akan terus menerus berlangsung sesuai dengan road map, berkolaborasi & bersinergi dengan seluruh institusi penelitian di Indonesia dan industri vaksin PT Bio Farma, sehingga diharapkan terjadi akselerasi kemandirian produk vaksin nasional.

ABSTRAK

Virus Dengue (DENV) sampai saat ini masih menjadi masalah kesehatan masyarakat di dunia dan menjadi salah satu prioritas program kesehatan di Indonesia. Vaksinasi merupakan salah satu alternatif potensial dalam pencegahan infeksi dengue. DENV adalah penyebab *DF* (*Dengue fever*), *DHF* (*Dengue haemorrhagic fever*) dan *DSS* (*Dengue shock syndrom*) yang merupakan kolaborasi ke 4 serotipe (DENV-1,-2,-3,-4). Keempat serotipe tersebut beredar di Indonesia dengan genotipe yang berbeda dengan negara lain. Epitope dominan yang berperan penting dalam patogenesis adalah protein struktural (protein prM-E) dan protein nonstruktural (NS1 dan NS3). Protein prM dan E dapat menginduksi respon imun humoral dan selular sehingga protein tersebut yang akan dieksplorasi sebagai bahan imunogen untuk kandidat vaksin.

Selanjutnya sesuai dengan tindak lanjut pertemuan konsorsium vaksin dengue dengan pihak industri (PT Biofarma), sejak tahun 2015 telah disepakati perubahan roadmap untuk keseragaman jenis vaksin dan metode pengembangannya. Jenis vaksin yang akan dikembangkan seragam di konsorsium hanya vaksin dengue subunit protein rekombinan prM/E tetravalen (DENV-1,-2,-3,-4) strain Indonesia dengan sistem produksi yang halal (*porcine free*). Metode untuk konstruksi dan produksi protein rekombinan dilakukan dengan 2 metode yaitu metode yang sudah dikembangkan di institusi masing-masing dan metode yang dikembangkan di Bio Farma di sistem ekspresi *Pichia pastoris*.

Hasil penelitian tahun 2016, telah diperoleh isolat DENV-1,-2,-3,-4 strain kandidat vaksin dan karakterisasi genetik virus dengue isolat Indonesia (Balitbangkes dan Eijkman). Untuk kandidat vaksin subunit protein rekombinan, telah diperoleh plasmid rekombinan prM/E DENV-1 genotipe I dan IV, prM/E DENV-2, DENV-3 dan DENV-4 yang telah diverifikasi dengan metode digesti, PCR dan sekuensing. Kemudian telah diperoleh juga hasil transformasi plasmid rekombinan ke sel inang *yeast P. pastoris* menjadi *P. pastoris* rekombinan prM/E DENV-1,-2,-3,-4 yang telah diverifikasi dengan metode PCR. Untuk *P. pastoris* rekombinan prM/E DENV-1 dan DENV-4 telah diverifikasi juga dengan metode sekuensing yang menunjukkan hasil gen pengkode protein rekombinan memiliki homologi (similaritas 100%) dengan sekuen protein aslinya dari *wild type* virus dengue strain Indonesia. Selanjutnya telah diperoleh juga protein rekombinan prM/E DENV-1 dan DENV-4 yang telah diverifikasi dengan metode SDS PAGE berukuran sekitar 56 kDa dan Western Blot yang menunjukkan bahwa protein rekombinan tersebut dapat mengenali antibody preMembran dengue dan antibody prM/E DENV-1,-2,-3,-4 dan tetravalent.

Kata kunci: Dengue, vaksin, protein rekombinan, tetravalen, strain Indonesia

DAFTAR ISI

	Hal
SK PENELITIAN.....	ii
SUSUNAN TIM PENELITI	vii
SURAT PERSETUJUAN ETIK	x
KATA PENGANTAR.....	xii
RINGKASAN EKSEKUTIF	xiii
ABSTRAK	1
DAFTAR ISI	2
I.PENDAHULUAN.....	9
II. TINJAUAN PUSTAKA	16
2.1 Infeksi Demam Berdarah Dengue (DBD)	16
2.2 Dengue Virus.....	19
III TUJUAN.....	24
3.1 Tujuan Umum:.....	24
3.2 Tujuan Khusus:.....	24
IV MANFAAT	25
V METODE	26
5.1 Kerangka pikir	26
5.2 Tempat dan Waktu Penelitian	27
5.3 Desain Penelitian.....	27
5.4 Sampel.....	28
5.5 Jenis Penelitian.	28
5.6 Cara Kerja.....	28
VI HASIL DAN PEMBAHASAN	41
6.1 PENELITIAN DI PUSLITBANG BTDK, BALITBANGKES	41
6.2 PENELITIAN DI BADAN PENGKAJIAN DAN PENERAPAN TEKNOLOGI (BPPT).....	64
6.3 PENELITIAN DI LEMBAGA BIOLOGI MOLEKULER EIJKMAN	76
6.4 PENELITIAN DI FK UNIVERSITAS GADJAH MADA	85
6.5 PENELITIAN DI FK UNIVERSITAS INDONESIA	97
VII KESIMPULAN DAN SARAN	117

7.1 Kesimpulan.....	117
7.2 Keterbatasan penelitian	117
7.3 Saran.....	118
DAFTAR KEPUSTAKAAN.....	119

DAFTAR GAMBAR

	Hal
Gambar 1. Protein struktural dan non struktural virus Dengue (Butrapet <i>et al</i> 2000).....	9
Gambar 2 Protein yang dihasilkan oleh genom virus Dengue serta target utama respon imun (Rothman, A. L. 2004).	10
Gambar 3. Road Map Riset Vaksin Dengue Nasional.....	15
Gambar 4 Perkembangan Konsorsium Vaksin Dengue.....	16
Gambar 5 Daerah Resiko Transmisi Dengue, 2007 (Data WHO).....	17
Gambar 6 Grafik Trend Data DBD di Indonesia	18
Gambar 7 Hasil pengukuran titer virus (plaque assay)	41
Gambar 8 Hasil elektroforesis Agarose 1% serotyping Virus Dengue metode Lanciotti.....	42
Gambar 9 Hasil Studi Insiliko Cloning prM/E D1 d Plasmid pPICZαA.....	43
Gambar 10 Visualisasi hasil konstruksi gen prM/E dengue virus serotipe 1 isolat 072 pada gel agarose 1 %	44
Gambar 11 Hasil pemotongan vektor dengan enzim restriksi XhoI dan NotI.....	45
Gambar 12 Hasil transformasi plasmid rekombinan prM/E DENV-1 dengan modifikasi stop kodon.....	45
Gambar 13 Hasil verifikasi plasmid rekombinan grouping dengan metode digesti XhoI dan NotI	46
Gambar 14 Hasil verifikasi plasmid rekombinan dengan metode digesti XhoI dan NotI	46
Gambar 15 Hasil verifikasi plasmid rekombinan dengan metode PCR dengan primer spesifik prM/E (a) dan primer spesifik AOX (b).....	47
Gambar 16 Hasil linierisasi plasmid rekombinan prM/E virus dengue serotipe 1	50
Gambar 17 Koloni <i>Pichia pastoris</i> rekombinan prM/E dengan modifikasi stop kodon	51
Gambar 18 Hasil identifikasi fenotif Mut pada medium MDH dan MMH	52
Gambar 19 Hasil isolasi manual pichia rekombinan	52
Gambar 20 Hasil Verifikasi <i>pichia</i> rekombinan dengan metode PCR primer AOX.....	53
Gambar 21 Hasil SDS Page ekspresi protein rekombinan dengan modifikasi stop kodon	54
Gambar 22 Hasil western blot protein rekombinan dengan modifikasi stop kodon dengan substart DAB.....	54
Gambar 23 Verifikasi <i>western blot</i> protein rekombinan prM/E supernatan dan pellet dengue virus 1 dan 4 dengan antibody anti Envelope 4G2-HRP (1:1000)	55
Gambar 24 Hasil verifikasi Western Blot protein rekombinan prM/E supernatan klon 11 dengan poliklonal antibody prM/E DENV 1 dan 2 (UI, 1: 10.000).....	55

Gambar 25 Hasil verifikasi western blot protein rekombinan prM/E supernatan klon 11 dengan poliklonal antibody prM/E DENV 3 dan 4 (UI, 1: 10.000)	56
Gambar 26 Hasil verifikasi Western Blot protein rekombinan prM/E supernatan klon 11 dengan poliklonal antibody prM/E DENV Tetravalent (UI, 1: 10.000).....	56
Gambar 27 Hasil Verifikasi <i>P. pastoris</i> rekombinan pPICZαA prM/E DENV-1 klon 11 dengan sekuensing.	57
Gambar 28 Hasil SDS Page 10% scale up ekspresi protein	58
Gambar 29 Hasil SDS 10% optimasi ekspresi dengan perubahan konsentrasi Methanol induksi	58
Gambar 30 Hasil analisa SDS 10% dengan gel stain free	58
Gambar 31 Western blot protein intraselular dengan antibody prM/E DENV 1 dan 4 (UI, 1:10.000).....	59
Gambar 32 Hasil PCR AOX koloni terpilih dari kultur medium ekspresi	59
Gambar 33 Hasil SDS Page supernatant ekspresi dengan metode Cardoso	60
Gambar 34 Hasil SDS page optimasi pertama Purifikasi Protein Rekombinan prM/E.....	60
Gambar 35 Grafik optimasi purifikasi IEC 1.....	61
Gambar 36 Hasil SDS page optimasi kedua Purifikasi Protein Rekombinan prM/E	61
Gambar 37 Grafik optimasi purifikasi IEC 2.....	62
Gambar 38 Hasil SDS page optimasi ketiga Purifikasi Protein Rekombinan prM/E.....	62
Gambar 39 Grafik optimasi purifikasi IEC 3.....	63
Gambar 40. Hasil western blot protein rekombinan hasil optimasi purifikasi	63
Gambar 41 Visualisasi hasil PCR gen pr-ME pada gel agarose 1%.....	64
Gambar 42 Hasil verifikasi keberadaan insersi gen pr-ME pada 16 plasmid yang dilakukan dengan metode digesti.....	66
Gambar 43 Hasil analisa sekuensing menggunakan primer AOX forward.	66
Gambar 44 Hasil translasi nukleotida hasil sekuensing dengan primer forward AOX ke sekuens asam amino	67
Gambar 45 Hasil analisa sekuensing menggunakan primer AOX reverse	67
Gambar 46 Hasil linearisasi plasmid rekombinan dengan enzim SacI.....	68
Gambar 47 Hasil transformasi plasmid rekombinan prM/E Dengue 3 pada <i>P. pastoris</i> strain GS115.....	70
Gambar 48 Hasil visualisasi PCR genom <i>P. pastoris</i> dengan primer AOX.....	72
Gambar 49 Hasil pertumbuhan ke-enam sampel pada media MMH dan MDH.....	73
Gambar 50 Visualisasi pita protein pr-ME jam ke 0, 24, 48, dan 72 pada SDS-PAGE	75

Gambar 51 Visualisasi pita protein internal sampel jam ke 72 pada SDS-PAGE.....	75
Gambar 52 Hasil western blot sampel pellet (LiAc 2 M + NaOH 0.4 M) jam ke 72 dengan anti- Pr-M.....	76
Gambar 53 Gambaran skematik sepasang primer yang didesain untuk kloning gen prM/E DENV-4 ke vektor ekspresi <i>P. pastoris</i>	77
Gambar 54 Alur kerja aktivitas kloning gen prM/E DENV-4 ke dalam plasmid pPICZα.	78
Gambar 55 Hasil amplifikasi PCR gen prM/E DENV-4 yang akan diklon ke dalam vektor ekspresi pPICZαA.	79
Gambar 56 Restriksi enzimatis sisipan gen prM/E DENV-4 dan vektor plasmid pPICZαA sebelum restriksi (uncut/U) dan sesudah restriksi (cut).....	79
Gambar 57 Hasil pemeriksaan koloni yang mengandung plasmid rekombinan sebelum (uncut) dan sesudah (cut) digesti enzim restriksi..	80
Gambar 58 Gambaran skematis hasil sekuensing plasmid rekombinan pPICZαA mengandung sisipan gen prM/E DENV-4 yang menunjukkan fitur yang didesain telah terimplementasi dengan baik.	81
Gambar 59 Hasil linerisasi (cut) plasmid rekombinan pPICZαA-prM/E menggunakan enzim <i>PmeI</i>	81
Gambar 60 Hasil penapisan fenotipe integran koloni <i>P. pastoris</i> mengandung sisipan gen prM/E DENV-4.	82
Gambar 61 Hasil seleksi fenotipe integran koloni <i>P. pastoris</i> mengandung sisipan gen prM/E DENV-4 menggunakan medium.	83
Gambar 62 Hasil SDS-PAGE ekspresi protein sampel supernatant <i>Pichia</i> rekombinan (lajur 1 dan 2) dan kontrol positif supernatant virus dengue (lajur 3), serta kontrol negatif <i>Pichia</i> tanpa kaset (lajur 4).	84
Gambar 63 Hasil karakterisasi protein rekombinan prM/E DENV-4 menggunakan antibodi anti prM (A) yang dikerjakan di BPPT dan Litbangkes, dan menggunakan antibodi anti prM/E (B)..	85
Gambar 64 Elektroforesis hasil PCR gen PrM/E DENV1-073 dengan template konstruk pGEMT-PrM/E DENV1-073	86
Gambar 65 Elektroforesis hasil pemotongan vektor pPicZαA dan gen target PrM/E DENV1-073 dengan enzim <i>NotI</i> dan <i>XhoI</i>	87
Gambar 66 Hasil biakan sel kompeten untuk hasil transformasi.....	89
Gambar 67 Hasil pembuatan <i>replica plate</i>	90

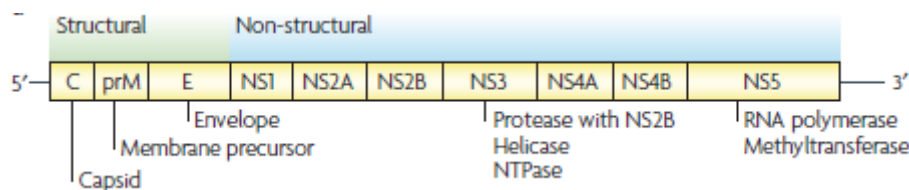
Gambar 68 Elektroforesis plasmid pPicz α - PrM/E-DENV1 yang diisolasi dari sel <i>E. coli</i> TOP 10 dengan perbandingan ligasi 1;3.....	92
Gambar 69 Elektroforesis plasmid pPicz α - PrM/E-DENV1 yang diisolasi dari sel <i>E. coli</i> TOP 10 dengan perbandingan ligasi 1;5.....	92
Gambar 70 Elektroforesis pemotongan konstruk pPiczA α -PrM/E-DENV1 dengan enzim <i>XhoI</i> dan <i>NotI</i> dari hasil transforman ligasi dengan perbandingan vektor: target 1 : 3.	93
Gambar 71 Elektroforesis pemotongan konstruk pPiczA α -PrM/E-DENV1 dengan enzim <i>XhoI</i> dan <i>NotI</i>	93
Gambar 72 Elektroforesis pemotongan konstruk pPiczA α -PrM/E-DENV1 dengan enzim <i>XhoI</i> dan <i>NotI</i>	94
Gambar 73 Elektroforesis produk PCR dengan menggunakan primer AOX.	95
Gambar 74 Elektroforesis hasil pemotongan dengan enzim <i>SacI</i> dan <i>HindIII</i>	96
Gambar 75 Hasil verifikasi plasmid rekombinan grouping dengan metode digesti <i>XhoI</i> dan <i>XbaI</i>	104
Gambar 76 Hasil verifikasi plasmid rekombinan dengan metode digesti <i>XhoI</i> dan <i>XbaI</i>	106
Gambar 77 Hasil verifikasi plasmid rekombinan dengan metode PCR dengan primer spesifik prM/E (a) dan primer spesifik AOX (b)	108
Gambar 78 Hasil linierisasi plasmid rekombinan prM/E virus dengue serotipe 2	112
Gambar 79 Hasil transformasi plasmid rekombinan pada <i>P. pastoris</i> strain GS115 dengan modifikasi stop kodon	114

DAFTAR TABEL

	Hal
Tabel 1. Pengembangan kandidat vaksin dengue (Kanesa-thasan N et al, 2001, WHO 2005)	12
Tabel 2 Kasus DBD di Wilayah Asia (WHO, 2010)	18
Tabel 3 Hubungan antara Tingkat Keparahan Penyakit Demam Berdarah Dengue dengan Serotipe Virus Dengue.....	19
Tabel 4 Perkembangan Vaksin Dengue	20
Tabel 5 Hasil identifikasi fenotif Mut pada transforman <i>P. pastoris</i> rekombinan prM/E	51
Tabel 6 Konsentrasi hasil isolasi genom pichia rekombinan prM/E Dengue 3	71
Tabel 7 Optimasi perbandingan vektor dan gen target untuk proses ligasi	88
Tabel 8 Rangkuman hasil transformasi yang telah dilakukan.	89
Tabel 9 Hasil pengecekan konsentrasi isolasi DNA plasmid rekombinan hasil transformasi dengan perbandingan ligasi vektor : gen target 1:3	91
Tabel 10 Hasil pengecekan konsentrasi isolasi DNA plasmid rekombinan hasil transformasi dengan perbandingan ligasi 1:5	91
Tabel 11 Desain Primer konstruksi gen prM/E dengue virus serotipe 2 dengan modifikasi stop kodon.....	98

I. PENDAHULUAN

Infeksi dengue masih menjadi salah satu masalah kesehatan utama dunia. *World Health Organization* (WHO) memperkirakan infeksi dengue di dunia berkisar 50-100 juta setiap tahun, termasuk 500.000 rawat inap untuk demam berdarah dengue, terutama pada anak-anak, dengan angka kematian lebih dari 5% di beberapa daerah (Guzman *et al* 2010). Di Indonesia, pengendalian infeksi dengue merupakan salah satu program prioritas utama dan tercantum pada sasaran ke 2 dari Rencana Strategis (renstra) tahun 2010-2014 Kementerian Kesehatan yaitu menurunnya angka kesakitan DBD dari 55 menjadi 51 per 100.000 penduduk dan pada renstra tahun 2015-2019 menjadi kurang dari 49 per 100.000 penduduk. Sampai saat ini obat anti virus Dengue belum ada dan program pengendalian vektor masih belum berhasil mencegah KLB DBD.



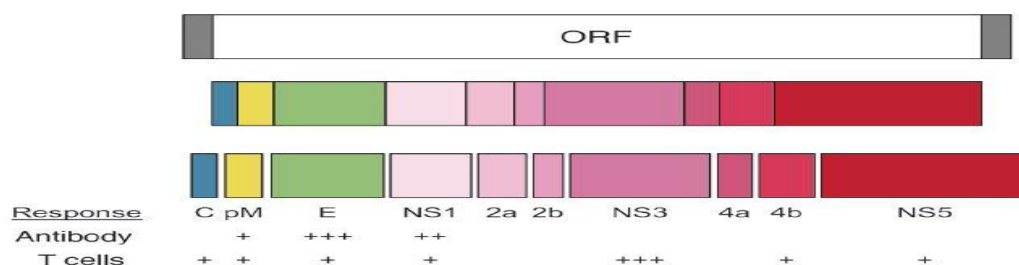
Gambar 1. Protein struktural dan non struktural virus Dengue (Butrapet *et al* 2000).

Protein DENV yang sudah dipelajari memiliki sifat imunogenik adalah protein Pre-membran (prM), Envelope (E), Non-struktural 1 (NS1) dan NS3 (Rothman 2004). Beberapa peneliti telah mengembangkan dan mengevaluasi kemampuan protein-protein ini sebagai kandidat vaksin. Dari semua protein DENV, protein E adalah imunogen yang paling baik dalam menginduksi respon imun humoral dalam bentuk antibodi netralisasi, sedangkan protein-protein non-struktural (seperti NS1 dan NS3) lebih berperan dalam menginduksi respon imun seluler (Rothman 2004, Konishi *et al* 2006, Costa *et al* 2011, Zheng *et al* 2011). Menurut Pengsaa *et al* (2011) antibodi netralisasi merupakan mekanisme proteksi utama dalam infeksi virus dan berperan penting untuk menghindari terjadinya reaksi *antibody dependent enhancement* (ADE) pada patogenesis DENV. Penelitian yang dilakukan oleh Kaufman *et al* (1987) melaporkan bahwa imunisasi pasif dengan antibodi anti protein E DENV pada mencit dapat memberikan proteksi terhadap uji tantang dengan DENV. Konishi *et al* (1993) menyatakan bahwa titer antibodi netralisasi merupakan penanda utama yang dievaluasi dalam pengembangan vaksin untuk kelompok Flavivirus.

Protein E DENV terdapat pada lapisan lipid bilayer virion yang mengelilingi protein kapsid yang mengandung glycoprotein. Protein ini berperan penting dalam proses pelekatan dengan reseptor sel inang yang kemudian diikuti oleh masuknya virus melalui proses

clathrin-mediated endocytosis. Monomer protein E terdiri dari 495 asam amino dengan ukuran protein sekitar 51-60 kDa (Rothman 2004, Heinz dan Stiasny 2012). Daerah protein E DENV mengandung epitop yang diketahui mampu memberikan respon imun yang bersifat protektif. Beberapa penelitian melaporkan bahwa pemberian vaksin DNA dengan gen sisipan prM-E pada mencit mampu menginduksi antibodi yang dapat menetralkan DENV. Uji tantangan dengan virus dari masing-masing serotipe pada mencit yang telah diimunisasi juga dapat mengaktifkan respon antibodi memori mencit (Clements *et al* 2010, Imoto dan Konishi 2007, Anderson *et al* 1992, Gebhard *et al* 2011, Raviprakash *et al* 2000).

Protein prM/M berperan sebagai protein *chaperone* yang berfungsi untuk melindungi protein E dari kondisi pH intraseluler yang rendah selama proses pematangan di lumen *trans-Golgi network* (TGN). Protein prM akan membentuk kompleks heterodimer dengan protein E pada virion yang *immature*. Selanjutnya, sesaat sebelum atau selama pelepasan virion yang *mature*, protein prM akan dipotong oleh *endoprotease furin* sel, sehingga menyisakan kompleks protein E dengan 75 asam amino protein M (Wang PG *et al* 2009, Wang S *et al* 1999). Infeksi oleh DENV menginduksi terbentuknya antibodi untuk protein prM/M. Antibodi yang terbentuk bersifat *cross-reaction* terhadap keempat serotipe DENV dengan kemampuan netralisasi yang rendah sampai sedang (Wahala WM *et al* 2011). Protein prM dan E dapat menginduksi respon imun humoral dan selular (Rothman, A.L. 2004).



Gambar 2 Protein yang dihasilkan oleh genom virus Dengue serta target utama respon imun (Rothman, A. L. 2004).

Virus dengue dapat menyebabkan tiga penyakit pada manusia yaitu *Dengue fever* (DF), *Dengue haemorrhagic fever* (DHF) dan *Dengue shock syndrome* (DSS). Infeksi akibat virus tersebut membedakan tingkat keparahan dari DF, DHF, dan DSS. DF jarang sekali menyebabkan kematian, tetapi menghasilkan beberapa gejala yang tidak spesifik. Sementara DHF tingkat keparahannya lebih serius, dengan gejala demam hebat, pembengkakan hati, bocornya plasma, *haemorrhage* dan *thrombocytopenia*. Selanjutnya DHF dapat berkembang menjadi DSS yang dapat menyebabkan kematian jika bocornya plasma sangat besar (Herrero *et al* 2013). Infeksi oleh satu serotipe virus Dengue menghasilkan kekebalan seumur hidup

terhadap serotipe tersebut. Namun, tidak terdapat kekebalan protektif silang antar serotipe sehingga seseorang yang tinggal di area yang endemik Dengue dapat terinfeksi oleh lebih dari satu serotipe virus dalam hidupnya (Guzman *et al* 2010). Hal ini juga membuka kemungkinan terjadinya infeksi oleh lebih dari satu serotipe virus secara bersamaan, terutama di daerah dimana terdapat lebih dari satu serotipe bersirkulasi (hiperendemik).

DENV diklasifikasikan ke dalam empat serotipe yaitu DENV-1, DENV-2, DENV-3 dan DENV-4. Virus dengue dapat menginfeksi individu sepanjang hidupnya, beberapa kali dengan serotipe yang berbeda. Infeksi virus dengue memberikan perlindungan jangka panjang terhadap serotipe yang sama (homotypic). Namun karena perbedaan sekuen diantara serotipe virus dengue, sel B dan sel T memori yang direaktivasi selama infeksi sekunder, tidak optimal berikatan dengan epitope pada infeksi virus baru (Rothman AL, 2011). Pengembangan vaksin dengue memiliki tantangan yang unik karena hanya mampu memberikan perlindungan jangka pendek terhadap serotipe yang berbeda, sehingga diperlukan ke empat antigen (DENV-1,-2,-3,-4) untuk dapat menghasilkan respon imun yang bersifat netralisasi terhadap ke 4 serotipe dengue.

Keempat serotipe dengue beredar di Indonesia dengan genotipe yang berbeda dari negara lain. Pemilihan strain virus yang tepat untuk dijadikan kandidat vaksin juga merupakan hal penting yang harus diperhatikan. Beberapa penelitian melaporkan bahwa distribusi genotype masing-masing serotype DENV bervariasi di beberapa wilayah. Masing-masing genotipe DENV yang bersirkulasi di Indonesia adalah: genotipe I/IV untuk DENV-1, genotipe Cosmopolitan untuk DENV-2, genotipe I untuk DENV-3 dan genotipe IV untuk DENV-4 (Dewi *et al* 2014, Gubler *et al* 1979, Mulyatno *et al* 2012, Ong *et al* 2008, Sumarmo *et al* 1986, Sasmono *et al* 2012, Yamanaka *et al* 2011). Laporan awal uji efikasi kandidat vaksin yang dikembangkan oleh lembaga Sanofi di Thailand memperlihatkan efikasi vaksin yang rendah (hampir tidak memberikan proteksi) untuk DENV-2 (Sabchareon *et al* 2012). Salah satu alasan penyebab rendahnya efikasi ini adalah diduga adanya perbedaan strain virus yang bersirkulasi di Thailand dengan strain virus yang digunakan sebagai kandidat vaksin. Beberapa peneliti telah menunjukkan adanya perbedaan kemampuan netralisasi antibodi terhadap strain virus yang berbeda. Diduga peningkatan aktifitas dalam menginduksi antibodi pada mencit dapat bervariasi, tergantung pada genotipe virus yang digunakan sebagai antigen (Sjatha *et al* 2013, Brien *et al* 2010, Shrestha *et al* 2010). Hasil terbaru kemajuan uji efikasi vaksin DENV dari kelompok Sanofi (termasuk data dari Indonesia) melaporkan bahwa profil keamanan kandidat vaksin cukup bagus, dengan efikasi yang masih rendah 56,5%. Efikasi untuk DENV-2 masih tetap yang terendah yaitu 35% diantara keempat

serotipe DENV yang lain (Capeding *et al* 2014). Selain itu, vaksin yang dikembangkan Sanofi Pasteur menggunakan virus vaksin Yellow fever yang dilemahkan dengan menggunakan rekayasa genetika mengganti gen struktural prM/E dengan virus dengue. Indonesia belum pernah dilaporkan adanya kasus *Yellow fever*, serta produk yang dihasilkan masih belum mempertimbangkan aspek halal. Sehingga masih terbuka peluang untuk pengembangan vaksin dengue yang lebih optimal, dengan pertimbangan keamanan serta produk yang halal.

Beberapa studi pengembangan vaksin dengue yang sudah dikembangkan di dunia dapat dilihat pada tabel di bawah ini:

Tabel 1. Status Pengembangan Vaksin Dengue di Dunia yang Sudah sampai Uji Klinis (Ghosh A, Dar L, 2015)

Jenis vaksin	Pengembang	Fase Uji Klinis
<i>Yellow fever-DENV chimeric viruses (Tetravalent viruses)</i>	NIH and St. Louis University Health Science Centre, Sanofi Pasteur	III
<i>Cell culture passage based live attenuated viruses (Tetravalent vaccine)</i>	WRAIR, GSK Biologicals	II
<i>Mixture of cell culture passage based attenuated virus and dengue-dengue intertypic chimeric viruses (Tetravalent Vaccine)</i>	Inviragen Inc.	II
Mixture of targeted mutagenesis based attenuated viruses and dengue-dengue intertypic chimeric viruses (Tetravalent viruses)	NIAID, NIH, Butantan Institute	I
Purified inactivated dengue vaccine (Tetravalent vaccine)	WRAIR, GSK Biologicals, Oswaldo Cruz Foundation	I
Recombinant subunit vaccine (Monovalent vaccine)	Merck and Co	I
DNA vaccine expressing prM and E protein (Monovalent vaccine)	Naval Medical Research Centre, WRAIR	I

Sesuai hasil evaluasi penelitian antara tim peneliti di konsorsium dan industri vaksin (PT Bio Farma) untuk percepatan produksi vaksin dengue, maka pada tanggal 11 Maret 2015 telah disepakati keseragaman jenis vaksin dan metode pengembangan vaksin dengue di konsorsium. Pengembangan kandidat vaksin dengue dengan pertimbangan:

- menggunakan seed yang halal (*porcine free*),
- menggunakan virus dengue serotipe 1,2,3,4 dengan strain paling dominan yang mewakili Indonesia (strain yang relatif baru) sehingga diharapkan menghasilkan respon imun humoral dan seluler yang optimal terhadap ke 4 serotipe dengue.
- Keamanan (termasuk untuk lingkungan: peredaran virus dengue di alam),
- Sudah dikembangkan teknologinya oleh institusi dan industri vaksin Bio Farma
- Kemudahan untuk regulasi

Sehingga dilakukan perubahan roadmap (Gambar. 3 dan 4) yaitu jenis vaksin yang akan dikembangkan seragam di konsorsium adalah hanya vaksin subunit protein rekombinan prM/E tetravalent (DENV-1,-2,-3,-4, strain Indonesia). Sehingga tujuan penelitian di konsorsium adalah mengembangkan vaksin subunit protein rekombinan dengue tetravalent menggunakan isolat Indonesia dengan produk halal yang menghasilkan respon imun optimal. Metode untuk konstruksi dan produksi protein rekombinan dilakukan dengan 2 metode yaitu metode yang sudah dikembangkan di institusi masing-masing dan metode yang dikembangkan di Bio Farma di sistem ekspresi *Pichia pastoris*. Metode yang dikembangkan oleh Bio Farma untuk vaksin protein rekombinan hepatitis B vektor plasmid pAO815 di sistem ekspresi *Pichia pastoris* sampai saat ini masih belum optimal, sehingga untuk pengembangan vaksin dengue di konsorsium dilakukan juga pengembangan dengan metode ekspresi lainnya sebagai alternatif. Sesuai masukan Bio Farma setelah workshop penyeragaman metode pada bulan September 2015, disarankan menggunakan vektor plasmid dengan sistem ekspresi ekstraseluler untuk memudahkan purifikasi protein rekombinan. Sehingga dilakukan perubahan vektor plasmid yang semula pAO815 menjadi pPICZ alpha dengan modifikasi penambahan stop kodon untuk menghindari residu asam amino lain yaitu *histidine* dan epitop c-myc dengan sistem ekspresi yang sama dengan Bio Farma yaitu sel *yeast Pichia pastoris*. Pembagian area penelitian untuk pengembangan vaksin tetravalen berdasarkan serotipe dengue strain Indonesia terpilih yaitu DENV-1 genotipe 1 di PBTDK, Balitbangkes, DENV-1 genotipe IV di FK UGM, DENV-2 genotipe cosmopolitan di FK UI, DENV-3 genotipe I di BPPT, DENV-4 genotipe II di LBM Eijkman.

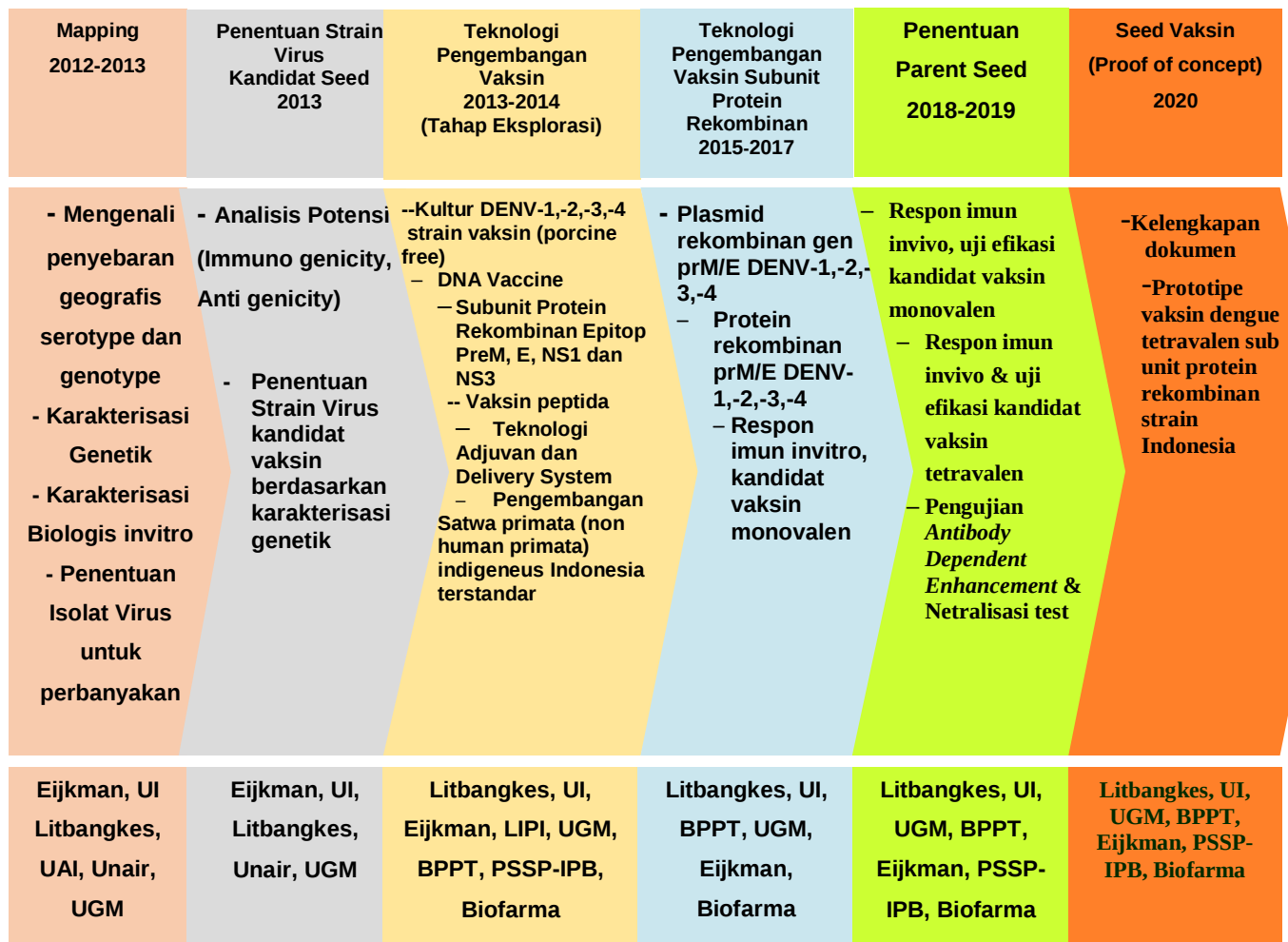
Hasil penelitian tahun 2015 yang merupakan tahun pertama, telah diperoleh isolat DENV-1,-2,-3,-4 strain kandidat vaksin dan karakterisasi genetik virus dengue isolat Indonesia (Balitbangkes dan Eijkman). Untuk kandidat vaksin subunit protein rekombinan, telah diperoleh plasmid rekombinan prM/E DENV-1 genotipe 1 di vektor pPICZαC dan pPICZαA dengan modifikasi yang sudah diverifikasi dengan metode digesti enzim restriksi,

PCR menggunakan primer AOX dan primer spesifik prM/E. Kemudian telah diperoleh juga plasmid rekombinan prM/E DENV-1 genotipe IV, DENV-2, DENV-3 dan DENV-4 yang juga telah diverifikasi.

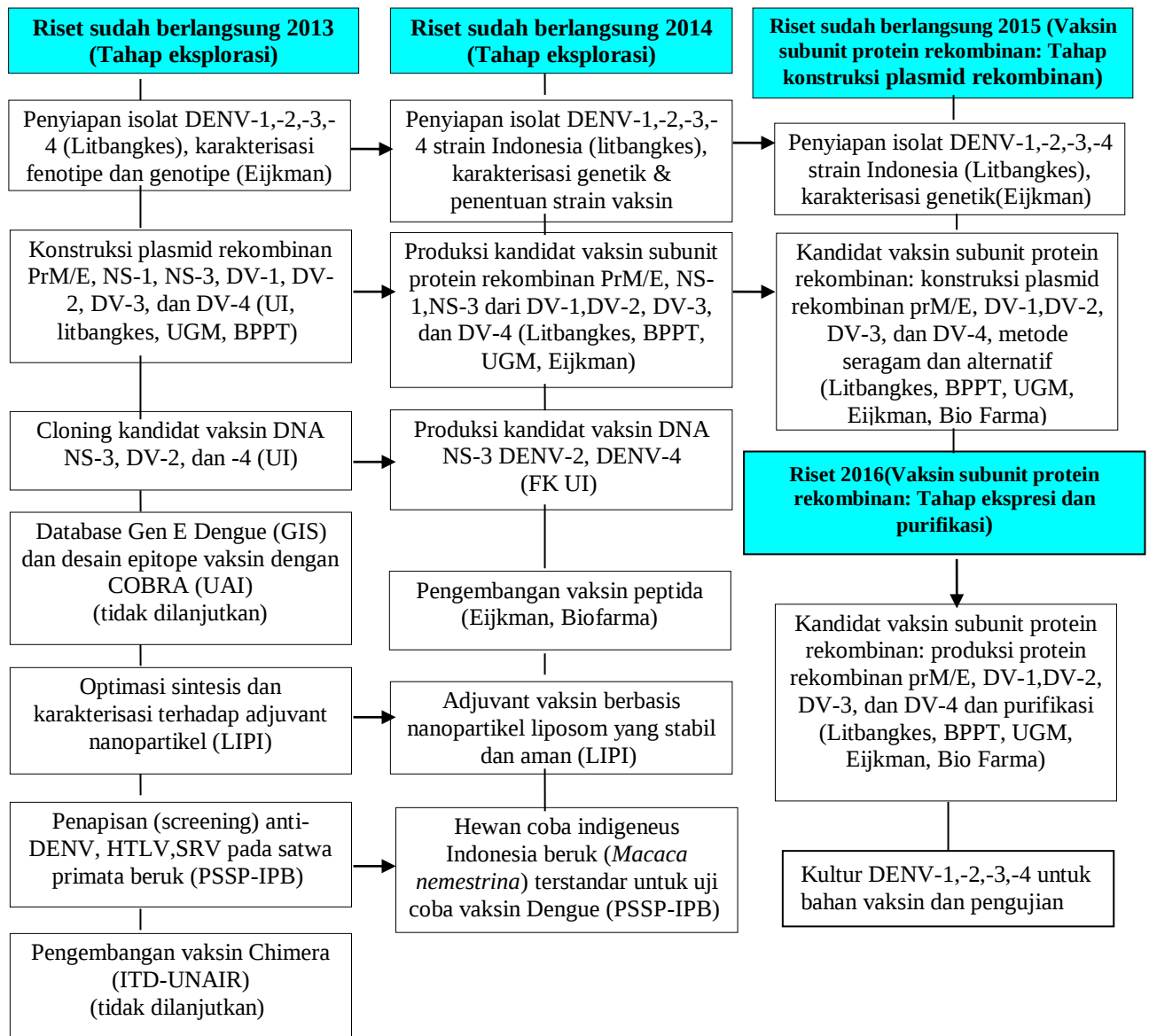
Selanjutnya hasil penelitian tahun 2015 yaitu plasmid rekombinan gen prM/E DENV-1,-2,-3,-4 masih perlu dilanjutkan ke tahun 2016 untuk mendapatkan protein rekombinan prM/E DENV-1,-2,-3,-4. Pada penelitian lanjutan tersebut, plasmid rekombinan yang mengandung gen insert prM/E DENV-1,-2,-3,-4 akan ditransformasi ke sel inang *Pichia pastoris* atau *E.coli*. Hasil transformasi yang sudah diverifikasi kebenarannya selanjutnya akan dioptimasi untuk proses ekspresi protein rekombinan. Protein rekombinan yang diperoleh selanjutnya akan dioptimasi pemurniannya.

Selain itu juga masih diperlukan penelitian lanjutan untuk mengkultur ke empat serotipe virus dengue strain kandidat untuk persediaan jika proses optimasi dilakukan berulang-ulang. Kemudian diperlukan juga kultur virus dengue untuk memperoleh titer yang tinggi yang akan dimanfaatkan sebagai bahan uji invitro maupun invivo kandidat vaksin. Virus dengue yang dibutuhkan untuk kultur dengan titer yang tinggi, bukan hanya yang digunakan pada 5 strain vaksin, tetapi juga pada isolat virus dengue lainnya untuk bahan pengujian imunogenisitas reaksi silang antar genotipe dan serotipe. Proses kultur virus dengue memerlukan waktu yang panjang dengan tingkat kesulitan yang cukup tinggi sehingga diperlukan penelitian dalam jangka panjang.

Road map riset vaksin dengue dan perkembangan riset vaksin dengue dapat dilihat pada bagan di bawah ini.



Gambar 3. Road Map Riset Vaksin Dengue Nasional



Gambar 4. Perkembangan Konsorsium Vaksin Dengue

I TINJAUAN PUSTAKA

1.1 Infeksi Demam Berdarah Dengue (DBD)

Kejadian luar biasa (KLB) dengue hingga saat ini masih merupakan salah satu masalah kesehatan yang utama di daerah tropikal dan sub tropikal di seluruh dunia terutama pada daerah urban dan suburban (WHO, 2000). Dengue ditransmisikan melalui gigitan nyamuk yang terinfeksi *Aedes aegypti* (vektor) dimana terdapat 4 serotypes yang berbeda (DEN-1, DEN-2, DEN-3, and DEN-4). *Dengue fever* memberikan gejala flu/demam yang sama seperti flu yang menjangkit bayi, balita, hingga dewasa dan terkadang menyebabkan kematian jika terlambat dideteksi dan tidak mendapatkan perawatan yang tepat.

Dengue Haemorrhagic Fever (DHF) merupakan ancaman hidup yang kompleks dengan indikasi demam selama 2 – 7 hari, fenomena hemoragik, turunnya platelet, dan kegagalan sirkulasi (Gubler, 1998). Walaupun mekanisme penyebab terjadinya DHF belum begitu dimengerti, namun diketahui bahwa antibodi dari infeksi dengue sebelumnya dapat mempengaruhi beberapa individu untuk berkembang menjadi DHF ketika terinfeksi kembali oleh serotipe dengue yang lain.

Infeksi Virus Dengue di Dunia

Di seluruh dunia, ada sekitar 2,5 miliar orang diperkirakan berisiko terinfeksi dengue dan sekitar 975 juta di antaranya hidup di daerah perkotaan di negara-negara tropis dan subtropis di kawasan Asia Tenggara, Pasifik dan Amerika. Diperkirakan lebih dari 50 juta infeksi virus dengue terjadi setiap tahunnya, termasuk 500.000 rawat inap untuk demam berdarah dengue, terutama pada anak-anak, dengan angka kematian lebih dari 5% di beberapa daerah (Guzman, 2010).

Jumlah rata-rata tahunan kasus demam berdarah/dengue demam berdarah (DF/DBD) yang dilaporkan kepada WHO telah meningkat secara dramatis dalam beberapa tahun terakhir. Untuk periode 2000-2004, rata-rata tahunan adalah 925.896 kasus, hampir dua kali lipat dari 479.848 kasus yang dilaporkan untuk periode 1990-1999. Walaupun tidak ada laporan resmi mengenai demam berdarah di negara-negara di Afrika dan wilayah Mediterania Timur, diperkirakan pada tahun 2005-2006 terjadi wabah demam berdarah di Pakistan, Arab Saudi, Yaman, Sudan dan Madagascar, dan wabah besar demam berdarah yang melibatkan > 17.000 kasus terjadi di pulau Cape Verde pada 2009. Epidemi demam berdarah dapat menjadi beban ekonomi dan kesehatan yang signifikan.

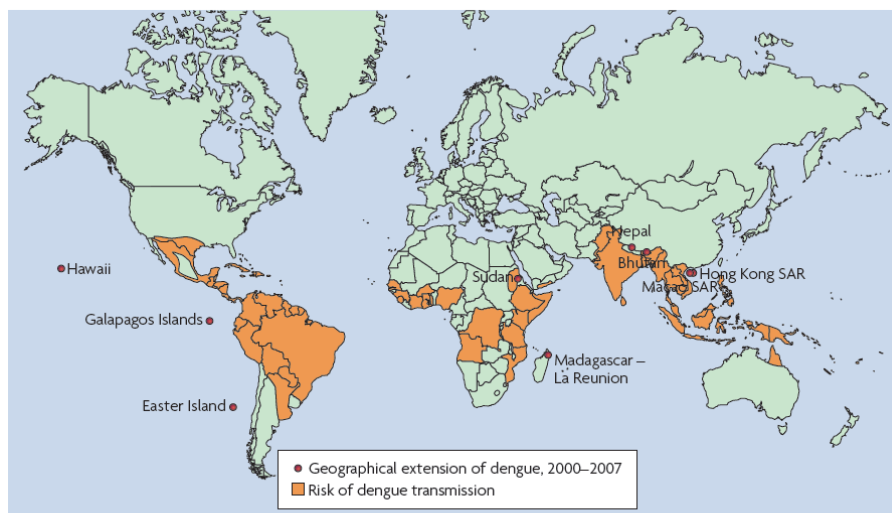


Figure 1 | Countries and areas at risk of dengue transmission, 2007. Data from WHO.

Gambar 5 Daerah Resiko Transmisi Dengue, 2007 (Data WHO)

Infeksi Virus Dengue di Indonesia

Menurut data WHO, selain Indonesia di kawasan Asia terdapat beberapa negara yang juga menghadapi KLB DBD seperti Bangladesh, India, Myanmar, Sri Lanka dan Thailand. Namun hingga tahun 2010, Indonesia masih merupakan negara dengan jumlah kasus tertinggi di wilayah Asia (WHO, 2010).

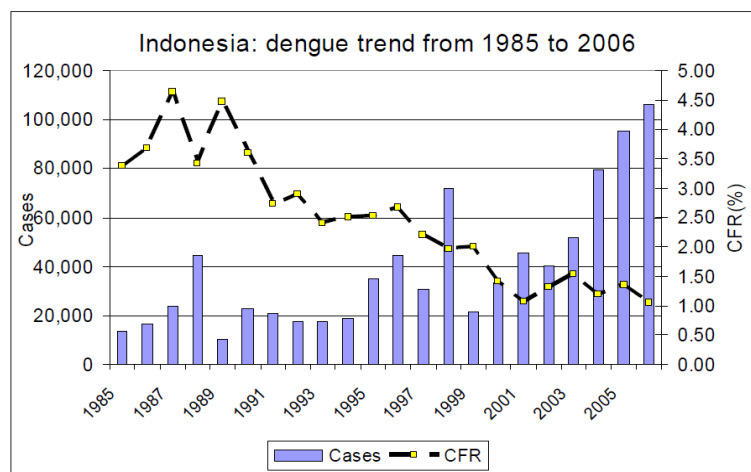
Tabel 2 Kasus DBD di Wilayah Asia (WHO, 2010)

Country	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010*
Bangladesh*	5,551	2,430	6,132	486	3,913	1048	2200	466	1153	474	76
Bhutan	0	0	0	0	2,579	11	116	86	73	351	16
DPR Korea	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
India*	650	3,306	1,926	12,754	4,153	11985	12317	5023	12561	15535	9357
Indonesia	33,443	45,904	40,377	51,934	79,462	95279	106425	157442	155607	156052	80065
Maldives	180	73	27	38	742	1126	2768	1680	1476	774	550
Myanmar**	1,884	15,695	16,047	7,907	7,369	17454	11383	15285	14480	24287	11704
Nepal	0	0	0	0	0	0	25	3	6	30	2
Sri Lanka	3,343	4,304	8,931	4,749	15,463	5994	11980	7314	6555	35010	27142
Thailand	18,617	139,327	114,800	62,767	38,367	45,893	42456	62949	89626	25194	57948
Timor Leste					434	1128	162	210	186	175	473
SEAR	63,668	211,039	188,240	140,635	152,482	179918	189832	250458	281723	257882	187333

*Only confirmed cases

**official data awaited

Menurut data dari Departemen Kesehatan RI, sampai dengan tahun 2005 kasus DHF sudah menyebar di seluruh provinsi di Indonesia. Tahun 2005, dilaporkan kasus 95.279 dengan angka kematian (*case fatality rate*, CFR) 1.36% dan angka insidensi 43,42 kasus per 100.000 penduduk. Pada tahun 2005, provinsi dengan kasus infeksi DHF di Indonesia terbanyak adalah DKI Jakarta (296,87 kasus per 100.000 penduduk), Kalimantan Timur (121,74 kasus per 100.000 penduduk), dan Sulawesi Utara (119,89 per 100.000 penduduk). Namun demikian, angka mortalitas (CFR) terjadi di Kepulauan Bangka-Belitung (4,35%) diikuti oleh Maluku (4,17%) dan Kepulauan Riau (3,49%).



Gambar 6 Grafik Trend Data DBD di Indonesia

1.2 Dengue Virus

Virus Dengue adalah famili Flavivirus dan merupakan satu family dengan Virus Yellow Fever, Virus West Nile, Virus Japanese Encephalitis dan Virus Tick-borne Encephalitis. Virus Dengue ini dibawa oleh nyamuk sebagai vektor dan arbovirus yang paling lazim di daerah tropis dan subtropis di dunia (Gubler, 1998). Terdapat empat serotipe virus Dengue yakni DEN1-4 yang memiliki sekuense yang homologous sebesar 65-70% (Rico-Hesse, 1990). Virus Dengue adalah virus RNA dengan untai tunggal positif. RNA genomik memiliki panjang sekitar 10,6 kb dan terdiri dari tiga struktural gen yang mengkode protein nukleokapsid atau protein inti (C), protein penyusun membran (M), protein amplop (E), dan tujuh protein nonstruktural (NS). Ketujuh protein nonstruktural yakni NS1, 2A, 2B, 3, 4A, 4B, dan 5 yang terlibat dalam replikasi virus di dalam sel (Henchal dan Putnak, 1990; Putnak et al, 2003).

Dalam studi terbatas yang dilakukan di wilayah Asia Tenggara, data awal menunjukkan hubungan antara tingkat keparahan penyakit demam berdarah Dengue dengan serotipe Virus Dengue seperti terangkum dalam tabel di bawah ini (Murrell, 2010).

Dengue serotype association to disease severity.
(Vaughn et al., 2000; Fried et al., 2010).

Dengue serotype	Association to dengue disease
DENV-1	Primary infection results in frequently more severe disease, when compared to DENV-2 or DENV-4
DENV-2	Secondary infection associated with more severe disease (twice as likely to result in DHF than DENV-4)
DENV-3	Primary infection results in frequently more severe disease, when compared to DENV-2 or DENV-4. A secondary infection, is twice as likely to result in DHF than DENV-4
DENV-4	Least associated with severe dengue disease

Tabel 3 Hubungan antara Tingkat Keparahan Penyakit Demam Berdarah Dengue dengan Serotipe Virus Dengue

Vaksin Dengue Ideal

Saat ini belum ada vaksin Dengue yang telah terbukti dapat memberikan perlindungan terhadap keempat serotipe dengue (WHO, 2009b). Hal ini menimbulkan keprihatinan karena meningkatnya infeksi demam berdarah dalam beberapa tahun terakhir, serta prevalensi terhadap empat serotipe virus Dengue telah berdampak terhadap peningkatan DBD.

Dalam rangka merancang vaksin Dengue ideal yang dapat melindungi semua serotipe namun tidak meningkatkan potensi risiko keparahan penyakit, maka mekanisme molekuler patogenesis demam berdarah harus dipertimbangkan. Hingga saat ini, pengembangan vaksin

dengue ideal merupakan sebuah tantangan besar. Sebuah vaksin potensial harus memberikan keseimbangan antara tingkat imunogenisitas yang ditimbulkan dan melemahkan patogenisitas virus dengue. Imunogenisitas yang diinduksi oleh vaksin ini harus sedemikian rupa sehingga tingkat antibodi yang dihasilkan harus cukup tinggi untuk memberikan perlindungan lengkap terhadap keempat serotipe namun harus telah cukup dilemahkan sehingga tidak menimbulkan patogenisitas (Miller, 2010).

Vaksin Dengue yang saat ini dikembangkan dan statusnya dirangkum didalam tabel 4. di bawah ini (Murrell, 2010). Vaksin dengue chimera yang dikembangkan oleh Sanofi Pasteur telah dilisensi di beberapa negara termasuk Indonesia pada tahun 2016.

Table 2
Current status of dengue vaccine development.
(Whitehead et al., 2007; Hombach, 2007; Letson et al., 2010).

Vaccine type	Developed by	Collaborator	Method	Status
Live attenuated virus (LAV)	Mahidol University, Thailand	Sanofi Pasteur	Attenuated DV strains by serial passages in primary dog kidney cells, African green monkey cells, and fetal rhesus monkey cells	Completed Phase II, but no further testing
	Walter Reed Army Institute of Research (WRAIR), USA	GlaxoSmithKline (GSK)	Tetavalent LAV by serial passage in dog kidney cells	Phase II
	National Institutes of Health (NIH), National Institute for Allergy and Infectious Diseases (NIAID), Laboratory of Infectious Diseases (LID), USA	Biological E, Panacea Biotech, Butantan, Vabiotech	Use reverse genetics including a 30 nucleotide deletion in the 3' un-translated region of the genome of all four DV strains	Phase I/II
Live chimeric virus	Center for Disease Control (CDC), USA	Inviragen	Using structural protein genes from DV1, 3 and 4 into attenuates PDK53 DV2 genome. The DV2 genome was attenuated by replacing a portion of the 3' stem and loop structure with West Nile Virus	Phase I
	Acambis, USA (acquired by Sanofi Pasteur in 2008)	Sanofi Pasteur	Using Yellow Fever 17D vaccine strain as a backbone, and replacing the M and E protein coding sequences in YF virus with DV serotype sequences. The tetavalent combination of DV is showing promise. DV genes inserted into new, non-replicating adenovirus vector (Ad5). The vectors produce recombinants expressing prM and E sequences from DV1, 2, 3, and 4.	Phase III
Live recombinant, DNA, and subunit	Naval Medical Research Center, USA		DV genes inserted into new, non-replicating adenovirus vector (Ad5). The vectors produce recombinants expressing prM and E sequences from DV1, 2, 3, and 4.	Phase I
	Hawaii Biotech Inc., USA		Uses the truncated amino-terminal, 80% of E glycoprotein from each DV serotype and the entire NS1 protein from DV2, formulated in a proprietary adjuvant.	Preclinical

Tabel 4. Perkembangan Vaksin Dengue

Protein struktural yang bersifat imunogenik dan berperan pada respon imun humoral untuk pengembangan vaksin adalah protein prM dan protein E. Protein prM/M berperan sebagai protein *chaperone* yang berfungsi untuk melindungi protein E dari kondisi pH intraseluler yang rendah selama proses pematangan di lumen *trans-Golgi network* (TGN). Protein prM akan membentuk kompleks heterodimer dengan protein E pada virion yang *immature*. Selanjutnya, sesaat sebelum atau selama pelepasan virion yang mature, protein prM akan dipotong oleh *endoprotease furin* sel, sehingga menyisakan kompleks protein E dengan 75 asam amino protein M. Proses pemotongan prM pada DENV tidak terlalu efisien (Wang PG et al 2009, Wang S et al 1999), hal ini dibuktikan dengan ditemukannya sejumlah besar partikel DENV yang masih memiliki protein prM selama dipropagasi pada galur sel mamalia (Vero dan BHK21) maupun sel serangga (C6/36) Wang S et al 1999, Zybert IA 2008). Virion DENV yang *immature* ini bersifat non infeksius. Rendahnya

efisiensi maturasi virion kemungkinan menjadi salah satu alasan sulitnya mendapatkan titer DENV yang tinggi selama proses propagasi (Khan AM et al 2008, Zybert IA et al 2008, Jain B et al 2014).

Infeksi oleh DENV menginduksi terbentuknya antibodi untuk protein prM/M. Antibodi yang terbentuk bersifat *cross-reaction* terhadap keempat serotipe DENV dengan kemampuan netralisasi yang rendah sampai sedang (Wahala WM et al 2011). Beberapa penelitian menunjukkan adanya keterlibatan antibodi terhadap protein prM/M dalam mendukung terjadinya fenomena ADE pada kasus infeksi sekunder (Guzman MG et al 2010).

Protein E Flavivirus adalah protein fusi "kelas II" yang terdapat pada lapisan lipid bilayer dari virion dengan mengelilingi protein kapsid. Protein E berperan penting dalam proses pelekatan dengan reseptor sel inang yang kemudian diikuti oleh masuknya virus melalui proses *clathrin-mediated endocytosis*. Protein E, dalam kondisi pH netral, terletak sejajar dengan permukaan membran virus sebagai unit dimer atau trimerik, dengan masing-masing unit monomer berikatan ke membran virus pada daerah transmembran karboksi terminal Allison SL et al 1999, Rey FA 2003).

Monomer protein E terdiri dari sekitar 495 asam amino yang mengalami glikosilasi. Protein E DENV memiliki potensi situs glikosilasi di Asn-67 dan Asn-153. Pengaturan situs glikosilasi spesifik antara serotipe (Johnson AJ et al 1994). Hilangnya situs glikosilasi pada DENV-2 mengakibatkan toleransi terhadap pH tinggi, sehingga berpengaruh pada perubahan konformasi protein yang diperlukan untuk fusi virus. Situs glikosilasi diduga juga berperan dalam interaksi DENV dengan DC-SIGN yang merupakan reseptor lektin tipe C (Modis Y et al 2005).

Protein E DENV sebagian besar terdiri dari struktur *coil* dan *beta sheet* serta tidak mengandung segmen *alpha heliks* yang panjang (Rey FA et al 1995). Analisis difraksi sinar X terhadap struktur fisik protein E dari *Tick-borne Encephalitis virus* (TBEV), virus yang satu familia dengan virus dengue, menunjukkan adanya 3 struktur utama pada bagian N-terminal protein (ektodomain). Pembagian daerah ektodomain berupa: domain I, II dan III. Daerah ektodomain memiliki fungsi biologis yang sangat penting bagi virus, sehingga bentuk konformasi protein sangat mempengaruhi aktifitasnya. Selain domain utama, pada protein E juga terdapat domain tambahan berupa daerah *stem* dan *anchor*. Penjelasan mengenai masing-masing domain yang terdapat pada protein E berupa (Rey FA et al 1995, Hsieh SC et al 2008):

a. Domain I

Merupakan domain pusat P yang *discontinuous*, yang berada pada posisi asam amino 1-51, 137-189 dan 285-302.

b. Domain II

Merupakan sebuah wilayah yang memanjang pembentukan dimer pada posisiasam amino ke 52-136 dan 190-284. Kedua *loop* menghubungkan segmen *discontinuous* domain I. Terdapat sekuen asam amino DRGWGNGCGLFGGK (pada posisi asam amino 98-111) berupa struktur *cd loop* yang mengandung peptida fusi internal. Sekuen asam amino pada struktur *cd loop* bersifat lestari diantara kelompok Flavivirus.

Dalam keadaan dimer, *cd loop* terletak pada celah hidrofobik dari protein E yang dikelilingi oleh epitop hidrofilik, yang akan menetralsir dan menghemagglutinati situs utama virus. Diduga wilayah domain II protein E flavivirus memiliki potensi fusi yang tinggal. Kemampuan fusi protein diduga dipengaruhi oleh kondisi pH yang rendah sehingga memungkinkan terjadinya interaksi protein dengan membran sel inang.

c. Domain III

Terletak di dekat C-terminal protein E (asam amino 303-395) dengan struktur menyerupai bentuk imunoglobulin. Domain III memiliki peran yang penting dalam proses penempelan virus pada reseptor sel inang. Hal ini dibuktikan dengan menguji efektifitas MAb pada domain III untuk mencegah penempelan DENV ke sel inang. Selanjutnya juga diketahui bahwa perubahan pada residu domain III mempengaruhi virulensi beberapa Flavivirus dan mempengaruhi kemampuan netralisasi virus. Perubahan asam amino dalam domain III dari TBEV di E309-E311 juga mempengaruhi struktur tersier protein TBEV E, yang dapat mempengaruhi pengenalan protein E oleh reseptor sel inang. Terdapat beberapa sekuen asam amino penting pada domain III protein E, diantaranya berupa asam amino E284-E310 dan E386-E411 yang merupakan domain yang akan berikatan membentuk jembatan heparan sulfat (HS). Asam amino ke E380-E389 pada protein E Flavivirus bersifat spesifik serotipe dalam proses replikasi di sel C6 /36.

d. Bagian *stem* dan *anchor*.

Bagian *stem* berada pada posisi asam amino ke 396-450 dari protein E dan memiliki dua bagian yaitu α -helices (E-H1 and E-H2) yang cenderung lestari pada kelompok semua Flavivirus. Peran bagian *stem* belum diketahui dengan jelas, namun diduga daerah E-H2 terlibat dalam stabilisasi heterodimer protein prM-E, sedangkan daerah E-H1 terlibat dalam trimerisasi ireversibel protein E pada kondisi lingkungan pH yang rendah.

Daerah *anchor* protein E (posisi asam amino ke 452-495) juga terdiri dari dua sekmen α -*helical* transmembrane (TM), yaitu E-TM1 and E-TM2. Berdasarkan studi pada TBE virus, E-TM2 mengandung sekuen yang berfungsi sebagai sinyal bagi NS1, dan transmembran E-TM1 *anchor* diperlukan dalam proses perakitan protein E menjadi sebuah partikel virus. Penelitian yang dilakukan oleh Hasieh et al, 2008 menunjukkan bahwa daerah TM dengue memiliki sinyal yang kuat untuk *endeplasmid reticulum* (RT).

Disamping berdasarkan struktur, berdasarkan sifat antigenesitas protein E juga dibagi menjadi tiga domain, yaitu domain A, B dan C. Domain A adalah struktur terputus dibentuk oleh kombinasi dari dua daerah pada posisi asam amino 50-125 dan 200-250 dari protein E. Antibodi terhadap domain A memiliki sifat netralisasi dan hemaglutinasi terhadap virus. Epitop bersifat reaktif terhadap semua golongan Flavivirus. Pada daerah antara asam amino 200-250 terdapat epitop yang dapat distabilkan oleh interaksi hidrofobik (Guirakhoo F, 1989).

Domain B adalah daerah yang berada diantara asam amino 301 dan 395 yang mengandung epitop spesifik. Antibodi terhadap domain B memiliki sifat netralisasi yang lebih lemah. Antigenisitas domain B dapat hilang oleh reaksi reduksi dan karboksimetilasi. Dengan kata lain, sifat konformasi domain ini bergantung pada jembatan disulfida yang menghubungkan asam amino 307 dan 338 (Guirakhoo F, 1989).

Domain C terdiri dari asam amino 132 - 177. Pada daerah ini terdapat situs glikosilasi di posisi asam amino ke 154 protein E TBEV. Sebagian besar epitop yang bersifat spesifik terhadap sub tipe tertentu terletak pada domain C. Epitop domain C resisten terhadap reaksi dengan SDS, yang berarti bahwa domain ini memiliki bentuk konformasi yang cukup stabil (Guirakhoo F, 1989).

II TUJUAN

2.1 Tujuan Umum:

Tujuan Umum Konsorsium:

Mengembangkan vaksin dengue tetravalen subunit protein rekombinan prM/E DENV-1,-2,-3,-4 dengan sistem dan produk halal serta menghasilkan respon imun optimal menggunakan isolat Indonesia.

2.2 Tujuan Khusus:

Tujuan Khusus Konsorsium

Tahap 2 (Tahun 2016):

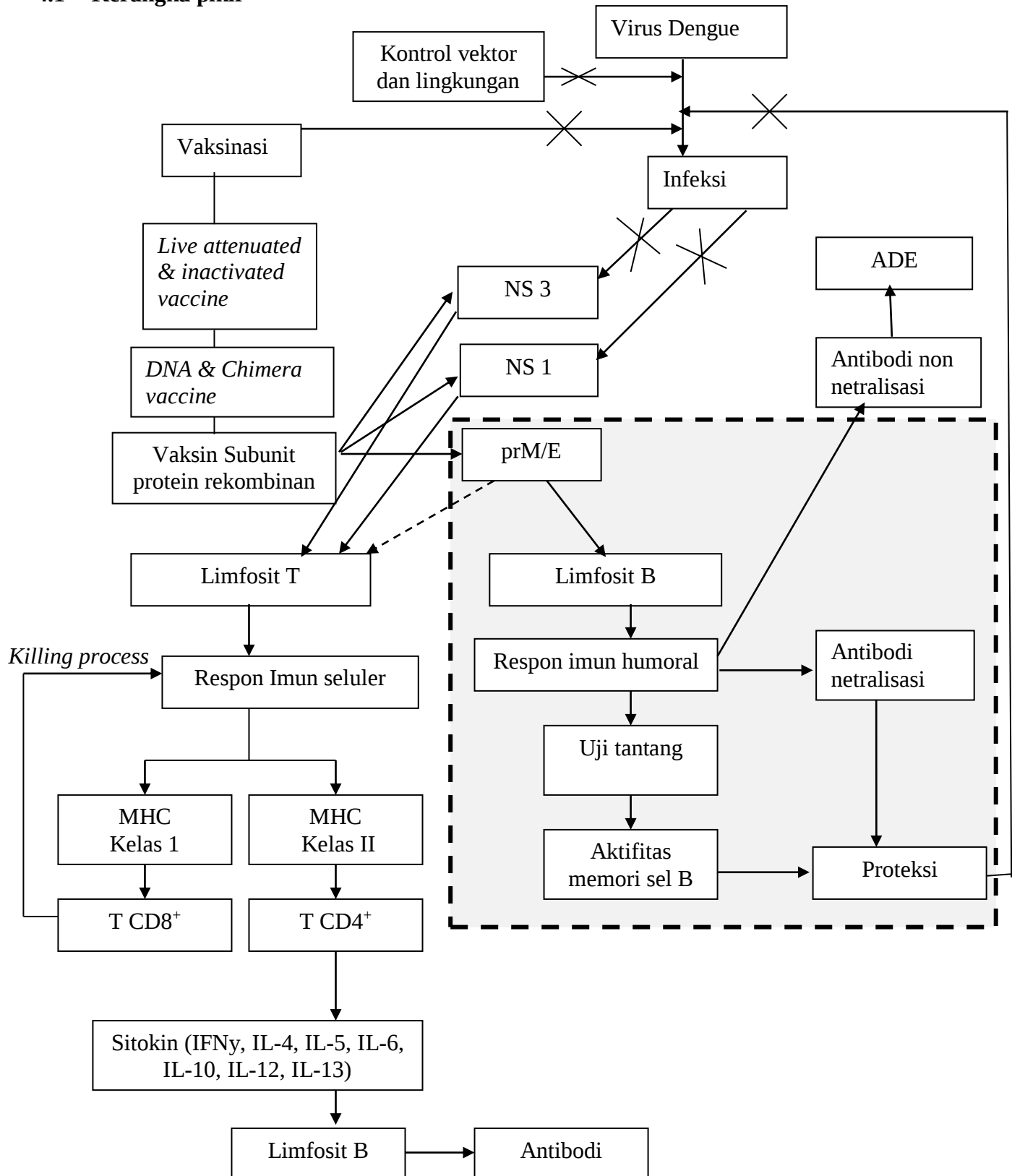
- a) Mendapatkan protein rekombinan gen prM/E DENV-1,-2,-3,-4 strain vaksin Indonesia yang diekspresikan pada sistem *Pichia pastoris* atau *E.coli*. Dilaksanakan PBTDK, Eijkman, UI, BPPT, UGM.
- b) Mendapatkan hasil purifikasi protein rekombinan prM/E DENV-1,-2,-3,-4 strain vaksin Indonesia. Dilaksanakan PBTDK, Eijkman, UI, BPPT, UGM, Bio Farma.
- c) Mendapatkan hasil kultur DENV-1,-2,-3,-4 strain Indonesia untuk pengujian kandidat vaksin Dengue (dilaksanakan Balitbangkes).

III MANFAAT

- Peneliti mendapatkan manfaat kerjasama penelitian yaitu saling berbagi pengetahuan, teknologi serta fasilitas penelitian.
- Hasil penelitian yang diperoleh, berpotensi memiliki hak paten dan dapat menjadi bahan untuk publikasi di media cetak nasional dan internasional.
- Memberikan informasi bagi ilmu dasar untuk pengembangan prototipe kandidat vaksin dengue strain Indonesia yang aman dan halal.
- Selain itu juga dapat digunakan sebagai bahan kit diagnostik dengue.
- Dalam jangka panjang memperoleh vaksin Dengue tetravalen dengan produk yang halal menggunakan strain Indonesia yang bersifat universal sehingga dapat melindungi anak dan dewasa terhadap infeksi virus Dengue dalam rangka kemandirian bangsa. Hasilnya dapat dimanfaatkan oleh Pemegang program pengendalian penyakit, masyarakat, industri dan institusi lainnya yang memerlukan alternatif vaksin Dengue untuk program pencegahan Demam Berdarah di masyarakat.

IV METODE

4.1 Kerangka pikir



Keterangan:

Virus dengue merupakan penyebab demam berdarah dengue dan menginfeksi manusia melalui gigitan nyamuk *Aedes aegypti*. Saat ini pencegahan terhadap infeksi dengue terutama adalah melalui kontrol vektor dan lingkungan. Vaksinasi juga merupakan salah satu strategi potensial untuk pencegahan. Jenis vaksin yang telah dikembangkan adalah *live attenuated*, *inactivated vaccine*, *DNA*, *chimera vaccine* dan vaksin sub unit protein rekombinan. Protein virus dengue yang berperan untuk menginduksi respon imun adalah protein prM/E, NS1, NS3. Pengembangan vaksin subunit protein rekombinan adalah dengan menggunakan protein prM/E, NS1, NS3 sebagai antigen. Protein nonstruktural NS1 dan NS3 terutama lebih berperan dalam merangsang sel T untuk menginduksi respon imun seluler melalui MHC kelas I dan MHC kelas II yang akan mengaktifkan sel sel T CD 4 dan T CD 8 (sel T sitotoksik) untuk mengeluarkan sitokin yang akan berperan pada proses lisis dari sel terinfeksi. Sehingga virus dengue masih dapat menginfeksi manusia dan masuk ke dalam sel yang kemudian menjadi target respon imun seluler untuk proses lisis sel terinfeksi. Sedangkan protein struktural prM/E akan merangsang sel B untuk menginduksi respon imun humoral yang akan menghasilkan antibodi netralisasi untuk membunuh virus sebelum masuk ke dalam sel. Virus dengue yang akan menginfeksi kembali akan mengaktifkan memori sel B untuk membentuk antibodi netralisasi yang akan menetralkan virus sebelum menginfeksi sel. Protein prM/E juga berperan dalam menginduksi respon imun seluler namun tidak terlalu kuat. Sehingga pengembangan vaksin sub unit protein rekombinan di konsorsium memilih protein prM/E sebagai antigen karena dapat menginduksi respon imun humoral menghasilkan antibodi netralisasi sehingga mencegah infeksi virus. Selain itu juga dapat menginduksi respon imun seluler.

4.2 Tempat dan Waktu Penelitian

- Penelitian dilakukan di laboratorium Imunologi PBTDK Balitbangkes, BPPT, Eijkman, Universitas (UI, UGM), dan Biofarma.
- Waktu Penelitian dilaksanakan selama 10 bulan dari bulan Maret sampai Desember 2016.

4.3 Desain Penelitian

Desain penelitian adalah studi eksperimental.

4.4 Sampel.

Sampel adalah:

1. Isolat virus Dengue serotipe 1, serotipe 2, serotipe 3, dan serotipe 4 strain lokal Indonesia tahun 2009 koleksi Laboratorium Imunologi Pusat Biomedis dan Teknologi Dasar Kesehatan, Balitbangkes.
2. Plasmid rekombinan prM/E DENV-1,-2,-3,-4 hasil penelitian tahun 2015.

Kriteria inklusi:

1. Strain kandidat vaksin adalah isolat terpilih virus Dengue serotipe 1,2,3 dan 4 koleksi laboratorium imunologi PBTDK Balitbangkes tahun 2009-2010 yang mewakili genotipe umum yang ada di Indonesia. Strain tersebut adalah hasil penelitian tahun 2009 yang telah mendapat persetujuan Komisi Etik untuk penelitian pengembangan vaksin Dengue. Strain dipilih berdasarkan hasil karakterisasi genetik, sehingga diperoleh 5 nomer strain yang dapat digunakan kandidat vaksin. Strain tersebut mewakili virus dengue serotipe 1 genotipe I dan IV, virus dengue serotipe 2 genotipe cosmopolitan, virus dengue serotipe 3 genotipe I dan virus dengue serotipe 4 genotipe I.
2. Virus dengue untuk bahan pengujian adalah masing-masing serotipe 3 strain selain strain kandidat vaksin. Seluruh strain termasuk strain kandidat vaksin dilakukan kultur berulang hingga mencapai titer tertinggi.
3. Plasmid rekombinan prM/E DENV-1,-2,-3,-4 hasil penelitian tahun 2015 yang terverifikasi.

Kriteria eksklusi: isolat virus dengue serotipe 1,2,3,4 yang memenuhi kriteria inklusi namun tidak bisa hidup ketika dilakukan kultur ulang.

4.5 Jenis Penelitian.

Jenis penelitian adalah eksperimental laboratorium, yang merupakan lanjutan hasil penelitian tahun 2015.

4.6 Cara Kerja

1. Penyiapan virus Dengue serotipe 1, 2, 3 dan 4 strain lokal Indonesia.

1.a. Isolat virus Dengue serotipe 1, 2, 3, 4 di pasase kembali di sel C6/36 kemudian virus yang tumbuh diidentifikasi dengan metode *nested* PCR (Lanciotti RS et al, 1992).

Bahan dan reagen yang digunakan adalah 24 well *plate sterile* Costar, sel C6/36 (*Cloned Sing's Aedes albopictus line*) American type cell line collection (ATCC, CRL-1560), serum dilusi 1:10 dan 1:20 dalam PBS 1x yang sudah disaring untuk sterilisasi dengan *filter paper* dengan diameter 0,2 μm . Kemudian medium pertumbuhan yang digunakan terdiri dari 93% MEM dengan Earle's salts dan L-glutamin, 1% HEPES 1 M, 3% Sodium Bicarbonate 7,5%, 1% penicilin streptomisin dan 2% *heat inactivated fetal bovine serum*. Media pertumbuhan difilter menggunakan filter paper dengan diameter 0,2 μm filter paper. Prosedur kerja sebagai berikut, sel *monolayer* C6/36 dipersiapkan untuk isolasi dengue. Medium dikeluarkan dari sel yang sudah *monolayer*, kemudian 3 mL PBS ditambahkan dalam masing-masing flask untuk mencuci sel agar sisa-sisa sel yang tidak menempel pada permukaan flask terbuang sekaligus untuk mengurangi ikatan sel pada permukaan flask agar sel mudah di *scrapping*. PBS dikeluarkan dari sel yang sudah dicuci, Kemudian ditambahkan 3 ml medium kedalam masing-masing *flask*. Sel disuspensikan dalam medium dengan cara *scrapping* dan *pipetting*. Suspensi sel yang telah dikumpulkan diambil sebanyak 20 μl untuk didilusi dengan perbandingan 1:10 sel di dalam *trypan blue* untuk dihitung sel yang hidup dalam kamar hitung. Sisa suspensi sel yang telah dikumpulkan dan diperoleh hasil penghitungannya, didilusi ke medium pertumbuhan sampai konsentrasi sel menjadi 1×10^6 sel/ml. Kemudian suspensi sel sebanyak 1 ml dengan konsentrasi 1×10^6 sel/ml dimasukkan ke dalam 24 well *plate*. Selanjutnya diinkubasi pada suhu 28°C, dalam inkubator CO₂ 5% selama 1 atau 2 hari sampai sel menjadi *monolayer* dan siap untuk dinokulasi. Pada inokulasi pertama, medium dikeluarkan dari masing-masing *well plate* yang sudah *monolayer*, kemudian diberi tanda dengan nomer sampel dan kontrol negatif. Sel C6/36 yang sudah *monolayer* dan dibuang medianya diinokulasi dengan menambahkan 100 μl serum sampel yang telah di dilusi dengan perbandingan 1:10 dalam PBS. Sedangkan untuk kontrol negatif hanya berisi medium pertumbuhan. Kemudian diinkubasi pada suhu 28°C di inkubator CO₂ 5% selama 2 jam. Setelah itu, ditambahkan 1 ml medium pertumbuhan dengan 2% FBS dan diinkubasi pada suhu 28°C, dalam inkubator CO₂ 5% selama 7 hari.

Untuk inokulasi kedua, disiapkan sel C6/36 *monolayer* seperti inokulasi pertama kemudian diberi tanda. Sel yang sudah *monolayer* di *plate* inokulasi ke 2 dan dibuang medianya, kemudian diinokulasi dengan 100 μl supernatan dari *plate* inokulasi pertama. Kemudian diinkubasi pada suhu 28°C di inkubator CO₂ 5% selama 2 jam. Setelah itu ditambahkan 1 ml medium pertumbuhan dengan 2% FBS dan diinkubasi pada suhu 28°C, dalam inkubator CO₂ 5% selama 7 hari. Sel dipanen dengan *scrapping* dan pemipetan berulang-ulang, kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 1500 rpm selama 10 menit.

Selanjutnya dilakukan inokulasi ke 3 dan seterusnya untuk mendapatkan titer virus yang tinggi yang akan digunakan sebagai bahan pengujian. Sedangkan untuk bahan kandidat vaksin dilakukan hanya sampai inokulasi ke 2. Supernatan hasil inokulasi 2,3 dan 4 disaring menggunakan filter paper berukuran 0,2 μm , selanjutnya disimpan pada suhu -70°C .

1.b. Melakukan ekstraksi RNA, RT-PCR, nested PCR (Lancioti) dan Elektroforesis. Deteksi RNA untuk menentukan virus Dengue serotipe 1, 2, 3 dan 4 dilakukan dengan menggunakan primer spesifik DV-1, DV-2, DV-3 dan DV-4.

1.c. Tahap preservasi dan penghitungan titer virus.

Sel monolayer BHK 21, dibuang mediumnya dan ditambahkan 5 ml PBS (tanpa Ca dan Mg) pH 7,4 untuk membasil sel dan menghilangkan *Fetal Bovine Serum* (FBS) yang dapat menghambat kerja tripsin. PBS dibuang dan ditambahkan 1 ml Trypsin EDTA kemudian diinkubasi pada 37°C selama 5 menit. Sebanyak 2 ml MEM FBS 2% ditambahkan untuk menghentikan aktivitas tripsin. Supernatan sel dicampur sehingga gumpalan sel terlepas kemudian disentrifugasi 1500 rpm selama 5 menit. Supernatan dibuang dan ditambahkan MEM dengan FBS 10% kemudian dibagi ke dalam *plate 6 well* (sebanyak 1×10^6) per ml, diinkubasi selama 1 hari pada suhu 37°C dengan CO_2 5% hingga 75% sel menjadi *monolayer*. Sel diinfeksi dengan serial pengenceran 10 kali supernatan virus (mulai dari 10^1 dengan perbandingan 25 μl supernatan virus ditambah 225 μl medium MEM FBS 2%) sampai pengenceran 10^6 . Masing-masing 100 μl diambil dari setiap pengenceran ke sel BHK yang sudah disiapkan untuk menghitung virus dengan plaque (dibuat duplo).

Setelah 2 jam ditambahkan medium semi solid (MEM + FBS2% + methyl cellulosa 1%) dan diinkubasi 37°C dengan 5% CO_2 selama 7 hari. Kemudian sel difiksasi dengan formalin 10% dan diwarnai dengan gentian violet. Selanjutnya dilakukan penghitungan *plaque*.

2. Optimasi ekspresi Protein Rekombinan pada *Pichia pastoris*

2.a. Linearisasi Plasmid rekombinan

Plasmid rekombinan yang sudah dikonfirmasi keberadaan dan kebenaran orientasi insert untuk plasmid rekombinan pPICZ α A/prM/E, kemudian dilinearisasi dengan enzim *PmeI* untuk efisiensi proses transformasi. Campuran untuk reaksi linierisasi yang digunakan adalah 10x buffer 20 μL , enzim *PmeI* sebanyak 40 μL untuk kontrol negatif, 110 μL untuk DNA plasmid rekombinan, deionise water sampai volume 200 μL . Konsentrasi DNA yang dipakai adalah 10 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ untuk kontrol negatif pPICZ α A dan 13 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ untuk plasmid rekombinan. Campuran reaksi kemudian diinkubasi pada suhu 55°C selama 5 menit untuk

memaksimalkan proses linierisasi, kemudian diinkubasi pada suhu 37° C selama 4 jam, dan diinactive pada suhu 65° C selama 20 menit. Hasil linearisasi dianalisis dengan gel agarose 1% dan divisualisasi dengan Etidium Bromide. Kemudian dipurifikasi dengan protokol Wizard SV gel & PCR clean up system. Hasil purifikasi kemudian dihitung konsentrasinya menggunakan alat NanoView.

2.b Purifikasi Hasil Linierisasi

Plasmid rekombinan yang telah dilinierisasi kemudian dilakukan purifikasi dengan kit *Wizard SV Gel and PCR Clean-up system kit* (Promega, cat No. A9281 lot no. 0000160057). Prosedur kerja sesuai dengan protokol pada kit. Larutan hasil reaksi ligasi masing-masing ditambahkan larutan *membran binding* dengan volume yang sama. Kemudian diinkubasi pada suhu ruang selama 1 menit. Larutan dipindahkan ke tabung purifikasi, kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 14.000 rpm selama 1 menit kemudian dilanjutkan dengan proses pencucian dengan menambahkan 700 µl larutan pencuci. Kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 14.000 rpm selama 1 menit, ditambahkan kembali 500 µl larutan pencuci, disentrifugasi kembali dengan kecepatan 14.000 rpm selama 5 menit, disentrifugasi lagi dengan kecepatan 14.000 rpm selama 1 menit, kemudian ditambahkan 35 µl *nuclease free water*. Selanjutnya diinkubasi pada suhu ruang selama 1 menit, kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 14.000 rpm selama 1 menit, dan dipindahkan ke tabung sentrifugasi untuk disimpan pada suhu -20°C sampai akan digunakan. Konsentrasi DNA dihitung menggunakan alat NanoView.

2.c. Penyiapan sel *Pichia pastoris*

Inokulasi 5 strain *Pichia pastoris* pada media agar YPD (Yeast Extract Peptone Dextrose Medium) dengan campuran 1% yeast extract, 2% peptone, 2% dextrose, 2% agar. Strain *Pichia pastoris* yaitu: X-33, GS 115, KM 71H, GS 115/Albumin, GS 115/pPICZ/LacZ. Inkubasi pada suhu 28 °C selama 2 hari. Strain X-33, GS 115, KM 71H merupakan strain *Pichia pastoris* yang akan digunakan untuk proses ekspresi protein rekombinan, sedangkan strain GS115/His+Mut^S Albumin sebagai kontrol ekspresi dengan sistem sekresi dan GS115/pPICZ/lacZ Mut+β-galactosidase sebagai kontrol ekspresi intraseluler.

Tumbuhkan 3 strain ekspresi *Pichia pastoris* pada media YPD cair dengan inkubasi 28 °C overnight dengan shaker 250 rpm. Kemudian inokulasi kembali 0,1-0,5 ml kultur overnight ke media YPD baru semalam dengan inkubasi 28 °C di shaker 250 rpm sampai OD₆₀₀ = 1,3-1,5. Kemudian sentrifugasi sel pada 3500 x g selama 5 menit di 4 °C. Tambahkan 250 aquabidest steril dingin. Sentrifugasi sel pada 3500 x g selama 5 menit di 4 °C, tambahkan 20 ml 1M sorbitol dingin. Sentrifugasi sel pada 3500 x g selama 5 menit di 4

°C, tambahkan 1 ml 1M sorbitol dingin sampai volume akhir 1,5 ml. Simpan sel pada es dan gunakan pada hari yang sama. Jangan menyimpan sel.

2.d. Transformasi plasmid rekombinan ke strain *Pichia pastoris* (GS115, X33).

Plasmid rekombinan ditransformasi ke sel kompeten 3 strain *Pichia pastoris* menggunakan metode electroporator (Bio-Rad Gene Pulser). Protocol yang digunakan untuk *Pichia pastoris*. Setelah electroporator dilakukan, segera tambahkan 1 ml 1M Sorbitol dingin. Pindahkan isi cuvet ke tabung steril 15 ml. Inkubasi pada 30 °C tanpa dishaker selama 1-2 jam. Tanam 200 µl pada media YPD yang mengandung 100 µg/ml Zeocin. Inkubasi pada 28 °C selama 3-10 hari sampai terbentuk koloni. Tes transforman yang tumbuh untuk melihat fenotip Mut dan ekspresi protein.

2.e. Penentuan Fenotip Mut (Methanol Utilization Transformant)

Strain X33 dan GS115 dapat menghasilkan Mut⁺ dan Mut^S sehingga untuk mendapatkan Mut⁺ dilakukan pengujian pada media agar MDH dan MMH. Strain GS115 memerlukan Histidin 0,004% ketika ditumbuhkan pada minimal media. Campuran media agar MDH (Minimal Dextrose Medium + Histidin) adalah 1,34% YNB, 4x10⁻⁵% biotin, 2% dextrose, 15 g/L agar, 0,4% Histidin. Campuran media agar MMH (Minimal Methanol Medium + Histidin) adalah 1,34% YNB, 4x10⁻⁵% biotin, 0,5% methanol, 15 g/L agar, 0,4% Histidin. Inkubasi pada suhu 30°C selama 2 hari. Setelah 2 hari, lihat pertumbuhan yang terjadi. Fenotip Mut⁺ adalah jika strain tumbuh dengan normal pada kedua plate sedangkan Mut^S adalah jika strain tumbuh pada media MDH namun tidak tumbuh pada media MMH.

2.f. Identifikasi transformant plasmid rekombinan di *Pichia pastoris*

2.f.1. Isolasi DNA plasmid rekombinan di *Pichia pastoris*.

Dilakukan kultur single koloni pada medium YPD (Yeast Extract Peptone Dextrose Medium) dengan campuran 1% yeast extract (oxoid, 416451), 2% peptone (Himedia, cat. 91249-500 g lot no. BCBP8880), 2% dextrose (RM016-500 G lot no. 0000043079) yang mengandung 100 µg/mL zeocin. Kemudian diinkubasi pada suhu 28 °C selama overnight dengan shaker 250 rpm. Isolasi DNA plasmid rekombinan manual di *Pichia pastoris* dengan cara sebagai berikut:

Kultur yeast overnight dipanen, dengan sentrifuge selama 5 menit pada 1200xg suhu ruang, kemudian dibuang supernatan. Pelet diresuspen dengan destilated water steril, dan disentrifuge selama 5 menit pada 1200xg suhu ruang, kemudian dibuang supernatan. Tahap selanjutnya adalah memecah cell *pichia*. Resuspen pelet dengan 200 uL breaking buffer (2% (v/v) Triton X-100, 1% (v/v) Sodium Dodecyl Sulfate (SDS), 1mM NaCl, 10 mM Tris.Cl, pH

8.0, 1 mM EDTA, pH 8.0), campuran dipindahkan pada tube 1.5 mL, kemudian ditambahkan dengan glass beads setara dengan volume pellet. Ditambahkan 200 uL phenol/kloroform/Isoamylalkohol (25:24:1). Campuran kemudian divortex dengan kecepatan 8 selama 3 menit. Dilakukan tepat waktu, karena vortex terlalu lama dapat merusak DNA. Tambahkan 200 uL TE buffer dan vortex sebentar. Kemudian disentrifuge selama 5 menit pada 13.000 rpm suhu ruang, supernatan dipindahkan pada tabung baru. Kemudian ditambahkan 1 mL ethanol 100%, bolak balikan tabung kemudian disentrifuge selama 5 menit pada 13.000 rpm suhu ruang, supernatan dibuang kemudian resuspen pellet dengan 400 uL TE buffer. Tahap selanjutnya adalah menghilangkan kontaminan RNA dan mendapatkan DNA. Ditambahkan 30 uL DNase free-RNaseA 1 ug/mL, campur kemudian diinkubasi pada 37 °C selama 5 menit. Kemudian ditambahkan dengan 10 uL 4 M Ammonium Asetat dan 1 mL ethanol 100 %, kemudian pipet *up and down*. Campuran kemudian disentrifuge dengan kecepatan 14000 rpm selama 3 menit pada suhu ruang. Supernatan dibuang dan pelet dikeringkan. Resuspen DNA dengan 100 uL TE Buffer, kemudian dihitung konsentrasi DNA yang diperoleh dengan NanoView. Hasil isolasi kemudian dianalisis dengan elektroforesis gel agarose 1%. Dilanjutkan dengan visualisasi *GelDoc*

2.f.2. Identifikasi transformant plasmid rekombinan di *Pichia pastoris* dengan PCR

Identifikasi transformant plasmid rekombinan di *Pichia pastoris* dilakukan dengan PCR menggunakan primer spesifik AOX. Prosedur kerja PCR yang dilakukan sebagai berikut: campurkan Accuprime Supermix 22.5 uL, primer forward AOX 1 uL, primer reverse AOX 1 uL, dan cetakan DNA dengan konsentrasi maksimal sebanyak 200 ng/uL. Siklus suhu yang digunakan dengan primer AOX adalah denaturasi awal 94°C selama 2 menit, denaturasi pada 94°C selama 1 menit, annealing pada 55°C selama 1 menit, ekstensi 72 °C selama 3 menit dengan pengulangan sebanyak 40 siklus. Hasil identifikasi dengan primer AOX apabila mengandung plasmid rekombinan hasilnya akan diperoleh dua pita yakni pita DNA prM/E dengan ukuran 1983 pb dan pita gen AOX1 pada ukuran kurang lebih 2.200 pb. Hasil PCR kemudian dianalisis dengan elektroforesis gel agarose 1%. Dilanjutkan dengan visualisasi *GelDoc*.

2.f.3. Verifikasi transformant plasmid rekombinan di *Pichia pastoris* dengan sekuensing.

Verifikasi transformant juga dilakukan dengan sekuensing menggunakan primer spesifik prM/E DENV-1, -2,-3,-4 dan primer AOX1.

Prosedur kerja sekuensing sebagai berikut dengan tetap melakukan optimasi.

- Amplifikasi gen prM/E dengan protokol Platinum Taq DNA Polimerase menggunakan sepasang primer forward & reverse

Bahan: untuk 1 reaksi, jika lebih dikalikan

10 x PCR Buffer	5 ul
10 mM dNTP mixture	1 ul
50 mM MgCl ₂	1,5 ul
Primer forward (10 uM)	1 ul
Primer reverse (10 uM)	1 ul
cDNA	2 ul
Platinum Taq DNA Pol	0,2 ul
ddWater sampai	50 ul

Thermal cycle:

- Predenaturasi: 94°C selama 1 menit
- Melakukan amplifikasi 30 siklus PCR untuk: denaturasi: 94°C selama 30 detik
Annealing: 55°C selama 30 detik
Ekstensi : 72°C selama 2 menit

Buat reaksi master mix sekuensing:

Bahan untuk 1 reaksi:

5x CSA buffer with sucrose	0,55 ul
Primer	0,55 ul
BDDT	0,138 ul
ddH ₂ O	0,963 ul

Cara kerja:

Masukkan masing- masing 2 ul master mix ke tabung PCR, tambahkan sample DNA 1 ul. Tutup tabung dan spin down. Letakkan ke thermal cycler dengan program:

96°C selama 2 menit

35 siklus untuk:

96°C selama 10 detik

55°C selama 30 detik

60°C selama 1 menit

Kemudian dilakukan sequence reaction clean up (precipitation).

Isopropanol presipitasi:

- spin down larutan
- tambahkan 60 ul isopropanol 75% ke setiap tube
- inkubasi 4°C selama 15 menit, kemudian centrifuge tube selama 15 menit
- buang isopropanol hati-hati, jangan sampai pellet terjatuh.

Pencucian Ethanol:

- tambahkan 60 ul ul ethanol 70% ke setiap tube
- centrifuge tube selama 15 menit
- buang ethanol dan keringkan
- tambahkan ddH₂O 10 ul
- vortex dan spin down
- masukkan ke mesin Sekuen ABI

Hasil sekuensing dianalisis menggunakan software FinchTV dan Bioedit secara manual untuk memastikan kebenaran urutan dan arah orientasi sisipan gen prM/E.

2.g Ekspresi Protein Rekombinan prM/E di *Pichia pastoris*.

Koloni transformant yang sudah diidentifikasi dan diverifikasi kebenaran urutan dan arah orientasi sisipan dilakukan proses ekspresi. Cara kerja sebagai berikut:

2.g.1. Ekspresi Protein Rekombinan Strain *Pichia* (Mut⁺ secreted)

Ambil koloni tunggal lalu diinokulasikan kedalam 50 mL BMGY (1% yeast ekstrak, 2% peptone, 100 mM potassium phosphate, pH 6.0, 1.34% YNB, 4×10^{-5} % biotin, 1% glycerol) di dalam 50 mL tabung kultur lalu inkubasi di shaking inkubator pada suhu 28 °C selama 16 – 18 jam OD₆₀₀ = 2-6. Panen sel dengan cara setrifugasi pada kecepatan 2000 x g selama 5 menit di suhu ruang, lalu buang supernantannya. Resuspen pelet dengan medium 100 mL BMMY (1% yeast ekstrak, 2% peptone, 100 mM potassium phosphate, pH 6.0, 1.34% YNB, 4×10^{-5} % biotin, 1% metanol) untuk OD₆₀₀ = 1. Tempatkan kultur pada 500 mL baffled flask dan tutup dengan menggunakan 2 layers steril gauze / cheesecloth dan kembali diinkubasi. Tambahkan 100% methanol dengan konsentrasi finalnya 3.0 % dengan dua kali dosis pemberian, yakni setiap pagi sebanyak 1 % dan sore sebanyak 2 % untuk mempertahankan induksi. Pada hari ke-4 (72 jam) transfer kultur yang akan diekspresikan ke dalam 50 mL tabung mikrosentrifuge. Lalu disentrifugasi selama 10 menit 4000 x g pada suhu ruang. Untuk secreted expression, transfer supernatan pada separate tube dan simpan supernatan pada suhu -80°C. Analisis supernatan dengan menggunakan metode ekspresi protein yaitu Coomassie Stain SDS-PAGE dan Western Blot.

2.g.2. Konfirmasi Kebenaran Ekspresi dengan Analisis SDS-PAGE 10%

Preparasi sel pellet (Intraceluler dan Secreted Expression)

- Thaw pellet dan tempatkan pada es
- Untuk setiap 1 ml sampel, tambahkan 100µl Breaking Buffer dan resuspensi
- Tambahkan an equal acid-washes glass beads (ukuran 0.5 mm)
- Vorteks 30 detik dan di inkubasi pada es selama 30 detik. Diulang sampai 8 siklus
- Lalu di sentrifuge dengan kecepatan maksimum selama 10 menit pada suhu 4°C dan pindahkan supernatan pada tabung baru
- Ambil 50 µl supernatan dan mix dengan 50 µl 2x SDS-PAGE Gel Loading Buffer (Sampel Buffer)
- Panaskan selama 10 menit dan masukkan sampel sebanyak 10-20 µl kedalam well. Lalu di running

Preparasi Supernatan (Secreted Expression)

- Thaw pellet dan tempatkan pada es
- Ambil 50 µl supernatan dan mix dengan 50 µl 2x SDS-PAGE Gel Loading Buffer (Sampel Buffer)
- Panaskan selama 10 menit dan masukkan sampel sebanyak 10-20 µl kedalam well. Lalu di running.

Sebelum melakukan running SDS Page, perlu disiapkan gel SDS 10%, buffer SDS elektroforesis, *loading buffer (sampel buffer)*, *fixing solution*, *rapid comassie staining solution*, dan *destaining solution*.

Gel SDS 10% (2 buah) dibuat dengan mencampurkan 30% acrylamide 5 mL, 4X tris-Cl/SDS pH 8.8 (0.5 M tris-Cl berisi 0.4 % SDS) 3.75 mL, dH₂O 6.25 mL, 10% ammonium persulfate 100 uL, TEMED 10 uL. Masukkan kedalam cetakan gel SDS kemudian setelah kering, bagian atas diisi dengan stacking gel 5%. Campuran stacking gel 5 % adalah 30% acrylamide 0.83 mL, 4X tris-Cl/SDS pH 6.8 (1.5 M tris-Cl berisi 0.4 % SDS) 1.25 mL, dH₂O 2.87 mL, 10% ammonium persulfate 50 uL, TEMED 5 uL. Setelah itu dimasukkan cetakan well. Tunggu agar SDS hingga kering. Untuk running disiapkan 5 x elektroforesis buffer yakni 15,1 g Tris base, 72 g glycine, 5.0 g SDS ditambahkan dH₂O hingga 1 L. 2X loading buffer (sampel buffer) dibuat dengan mencampurkan 4.8 mL dH₂O, 1,2 mL 0.5 M tris-Cl SDS pH 6.8, 1 mL glicerol, 2 mL 10% SDS, dan 1 mg *bromophenol blue*.

Preparasi Supernatan (Secreted Expression) dilakukan dengan thawing supernatan dan tempatkan pada es. Ambil 50 µl supernatan dan mix dengan 50 µl 2x SDS-PAGE Gel

Loading Buffer (Sampel Buffer). Panaskan selama 5 menit pada suhu 100 °C dan masukkan sampel sebanyak 15 µl kedalam well dan 5 uL marker protein presained (Fermentas). Lalu dirunning SDS PAGE 10% dengan tegangan 50 ampere selama 2 jam 30 menit. Hasil elektroforesis kemudian direndam dalam larutan *fixing solution* (25 % isopropil alkohol, 10 % acetic acid glasial) selama 15 menit dengan agitasi ringan. Buang cairan, kemudian diwarnai dengan larutan pewarna biru Coomasie *rapid comassie staining solution* (90 ml H₂O:metanol = 1:1, 10 ml asam asetat glasial dan 0,25 gr Brilliant Blue G) dengan penggoyangan pelan selama 2 jam. Warna yang berlebihan kemudian dihilangkan dengan larutan penghilang warna biru Coomasie *destaining solution* (5% metanol, 7% asam asetat glasial dan 88% H₂O) juga dengan penggoyangan pelan selama 1 hari, setelah itu gel poliakrilamid dikeringkan untuk dokumentasi.

2.g.3. Konfirmasi Kebenaran Ekspresi dengan Western Blot

Alat yang digunakan untuk transfer protein dari gel SDS ke kertas membran adalah Trans-Blot Turbo Transfer System Biorad. Membran yang digunakan untuk transfer adalah *Trans Blot Turbo™ PVDF starter kit Midi 0.2 uM* cat. #170-4156. Cara kerja yang dilakukan adalah sebagai berikut. *Bottom stack* dan membran ditempatkan pada tempat kaset. Gunakan blot roller untuk menghilangkan gelembung yang terjatuh pada membran dan stacking. Tempatkan gel diatas membran, jangan mengekuilibrasi gel sebelum ditransfer. Jika diperlukan, hilangkan gelembung udara dengan blot roller. Tempatkan transfer stack yang basar diatas gel. Hal ini berfungsi sebagai ion stack bagian atas. Roll lapisan dengan blot roller untuk menghilangkan gelembung yang terjebak dalam lapisan. Tutup dan kunci kaset lid. Masukkan ke dalam alat dan mulai transfer dengan menggunakan protokol sebagai berikut. Pilih protokol BIORAD → 2 mini format gels, 1 midi format gel → mix MW → 7 A, 50 V, 15 menit.

Setelah transfer selesai, ambil membran yang sudah mengandung protein dengan hati-hati, kemudian blocking membran dengan larutan BSA 3% dalam PBS selama overnight pada 4°C dengan agitasi ringan. Kemudian cuci membran dengan larutan *wash buffer* yakni PBS Tween 0.05% sebanyak 5x10 menit dengan agitasi ringan di 4°C. Membran kemudian diinkubasi dengan larutan antibody antipremembran DENV (1µg/mL) dengan perbandingan 1: 1000 dalam 0.5 % BSA / PBS Tween 0.05 % selama overnight dalam 4° C dengan agitasi ringan. Kemudian cuci membran dengan larutan *wash buffer* yakni PBS Tween 0.05% sebanyak 5x10 menit dengan agitasi ringan di 4°C. Membran kemudian diinkubasi kembali dengan *secondary antibody Goat anti Rabbit IgG (H&L) HRP Conjugate* cat no. # 1706515 dengan perbandingan 1:1000 dalam 0.5 % BSA / PBS Tween 0.05 % selama 3 jam dalam 4°

C dengan agitasi ringan. Pada tahap ini harus diperhatikan penutupan membran, karena HRP sangat pek terhadap cahaya, maka inkubasi dilakukan di ruang gelap. Kemudian cuci membran dengan larutan *wash buffer* yakni PBS Tween 0.05% sebanyak 5x10 menit dengan agitasi ringan di 4°C. Protein kemudian dideteksi dengan menggunakan substrat DAB ($C_{12}H_{14}N_{4.4}HCl$) cat. A0596.0010 lot no. 0R009352 (campuran 0.018 DAB ditambah dengan 30 mL PBS kemudian ditambah dengan 30 μL H_2O_2). Agitasi selama 5 menit kemudian dokumentasi hasil.

3. Peningkatan Ekspresi Protein Rekombinan

Koloni tunggal diambil lalu diinokulasikan kedalam 250 ml BMGY di dalam 1000 ml baffled flask lalu inkubasi di shaking inkubator pada suhu 28°C 250 rpm selama 16 – 18 jam hingga $OD_{600} = 2-6$. Kemudian sel dipanen pada $OD_{600} = 1$ dengan mensentrifugasi pada kecepatan 1500x g selama 9 menit di suhu ruang. Supernatant dibuang dan diresuspensi pellet pada 250 mL BMMY di 1 L baffled flask dengan tutup dengan menggunakan 2 layers steril gauze / cheesecloth lalu diinkubasi kembali pada suhu 28 °C dengan vigorous shaking (250 rpm). Methanol 100% ditambahkan dengan konsentrasi finalnya 3.0 % dengan dua kali dosis pemberian, yakni setiap pagi sebanyak 1 % dan sore sebanyak 2 % untuk mempertahankan induksi sampai pada waktu ke 72 jam. Sel dipanen dengan sentrifugasi 1500 x g selama 9 menit pada suhu ruang.

4. Purifikasi Protein Rekombinan prM/E DENV-1,-2,-3,-4 Strain Indonesia

Prosedur purifikasi perlu dilakukan optimasi dengan berbagai metode, sehingga diperoleh protein secara murni. Sebelumnya dipersiapkan reagen-reagen yang diperlukan untuk kegiatan pemekatan dengan menggunakan alat Tangensial Flow Filtration. Reagen yang disiapkan adalah larutan:

1. NaOH 0.5 M sebanyak 2 Liter
2. NaOH 0.1 M sebanyak 500 mL
3. Milique water sebanyak 3 L
4. Buffer Fosfat pH 8.0 (± 0.02) sebanyak 1 Liter

Sebanyak 0.2 g NaH_2PO_4 dan 3.4 gr $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$ kemudian dilarutkan hingga volume 1 Liter. Adjust pH dengan NaH_2PO_4 apabila larutan lebih basa dari pH 8.0, dan Na_2HPO_4 apabila larutan lebih asam dari pH 8.0.

pH yang diperoleh adalah : 8.031 dan conductivity = 3.54 ms/cm

5. Buffer Fosfat + Garam NaCl 1 M pH 8.0 sebanyak 2 Liter

Sebanyak 0.4 g NaH_2PO_4 dan 6.8 gr $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ dan 116.88 g NaCl kemudian dilarutkan hingga volume 1 Liter. Adjust pH dengan NaH_2PO_4 apabila larutan lebih basa dari pH 8.0, dan Na_2HPO_4 apabila larutan lebih asam dari pH 8.0.

pH yang diperoleh adalah : 8.023 dan conductivity = 83.4 ms/cm

Kemudian dilakukan conditioning kaset TFF sebelum running sampel protein rekombinan prM/E Dengue serotipe 1. Protokol yang digunakan adalah menghitung crossflow rate retentate. Range crossflow rate retentate yang harus tercapai adalah 30-50 mL/menit. Cara menghitungnya adalah dengan menghitung volume retentate yang keluar selama 1 menit. Apabila telah diketahui tekanan yang digunakan, maka dilakukan flushing dengan menggunakan larutan 0.5 M NaOH sebanyak 200 mL. Setelah kaset TFF di flushing dengan menggunakan larutan 0.5 M NaOH sebanyak 200 mL, maka kaset kemudian di flushing dengan water hingga pH netral. Pengecekan pH dilakukan setiap 200 mL water yang melewati kaset. Apabila pH permeate telah netral, maka kaset siap digunakan untuk memproses sampel.

Sampel protein rekombinan prM/ Dengue 1 yang telah cair sebanyak 500 mL kemudian disentrifuge dengan kondisi 6000 rpm selama 1 jam dalam 4 deg C. Hasil sentrifuge menunjukkan ada sedikit endapan. Artinya masih terdapat debris dalam supernatant protein. Sampel di sampling untuk proses SDS. Sampel kemudian difilter dengan filter ukuran 0.22 um dengan menggunakan vacum. Filtrate kemudian disampling untuk SDS.

Proses selanjutnya adalah TFF sampel yang telah difilter dengan filter 0.22 um. Sebelum sampel di pekatkan, maka dilakukan conditioning kaset dengan menggunakan medium sampel hingga kaset tercuci (± 100 mL). Kaset yang digunakan adalah Membrane : Biomax-10, nMWCo kDa or microns : 10, approximate molecular weight range of solutes retained >99%, kD : 50 – 100 (growth factors, hormones), Pellicon xL 50 Cassette Catalogue no: PXB0 10A 50. Pada tahap ini retentate dan permeate ditampung dan dikembalikan ke tempat sampel. Kemudian dilakukan pemekatan sampel protein rekombinan prM/E Dengue 1 dengan volume awal sampel sebanyak 400 mL menjadi konsentrate sebanyak 40 mL. sampel retentate dan permeate di sampling untuk SDS.

Apabila sampel telah terkonsentrate maka dilakukan buffer exchange dengan buffer fosfat pH 8.0 conductivity 3.54 ms/cm. Ditambahkan buffer fosfat sebanyak 300 mL pada sampel yang terkonsentrat. Dan dilewatkan pada kaset TFF dengan tekanan pompa sebanyak 1.5 bar. Setiap 10 menit selang retentate di klamp sekitar 1 menit untuk membersihkan filter kaset. Setiap waktu, sampel permeate disampling untuk diukur pH dan conductivity nya untuk

melihat apakah sampel telah terganti buffernya dengan buffer fosfat. Hasil progress sampling dilihat pada table berikut. Setelah dilakukan buffer exchange, kemudian filter kaset TFF di bersihkan dan disimpan pada larutan storage. Filter di aliri dengan larutan NaOH 0.5 M suhu 60 deg C selama 30-60 menit dengan tekanan pompa 1.5x bar yang digunakan sebelumnya. Tekanan yang digunakan adalah 2.2 bar. Kemudian dialiri dengan water selama 30-menit hingga pH permeate netral. Setelah itu, kemudan dialiri dengan larutan storage NaOH 0.1 M dan kaset filter dapat disimpan

Selanjutnya dilakukan packing coloum IEC yakni DEAE Sepharose Fast Flow. Buffer diapkan yakni buffer A. 20 mM Posphat Buffer pH 8.0 dan buffer B. 20 mM Posphat Buffer + NaCL 1M pH 8.0. Setelah itu,coloum yang dipacking, nantinya akan dihitung asimetrinya, HETP (teoritical plate), dan ekuilibrasi. Kolom yang dibuat adalah kolom dengan tinggi 10 cm dan diameter tabung 16 mm. maka untuk mengitung volume resin yang diperlukan adalah:

$$r = 0.8 \text{ cm}$$

$$V = \pi r^2 t$$

$$= 3.14.(0.8)^2.10$$

$$= 20.0096 \text{ cm}^3 = 20 \text{ mL}$$

Resin yang disiapkan sekitar 26 mL, hal ini dikarenakan untuk kompensasi facking factor karena gravitasi. 26 mL diperoleh dari perhitungan 1.3 X resin yang diperlukan (1.3 x 20 mL). Sampel konsentrat yang akan dipisahkan dengan IEC harus sama pH nya dengan buffer. Karena pH sampel protein masih 7 maka di adjust pH dengan larutan Na₂HPO₄ karena kurang basa. Setelah diadjust pH maka diperoleh pH sampel = 8.00 dan konduktivty sebesar 10.99 ms/cm. Ion Exchange Chromatography dengan menggunakan Akta Purifier dengan Resin DEAE FF.

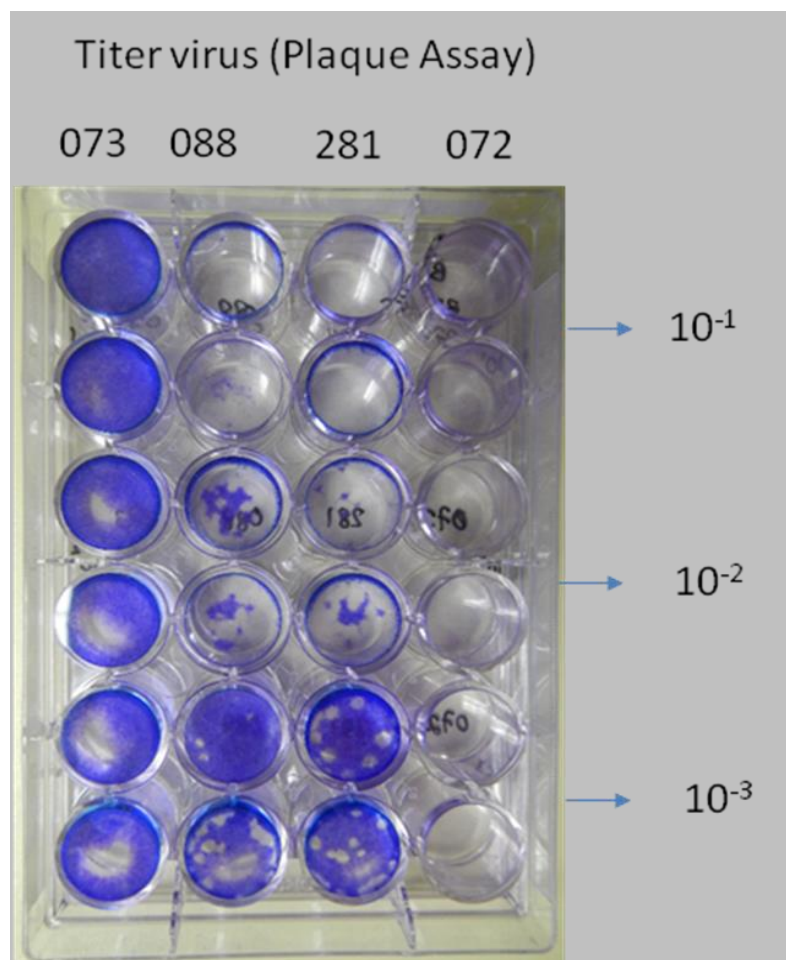
V HASIL DAN PEMBAHASAN

5.1 PENELITIAN DI PUSLITBANG BTDK, BALITBANGKES

Penyiapan isolat virus Dengue serotipe 1, 2, 3 dan 4 strain lokal Indonesia.

Kultur virus yang digunakan oleh anggota konsorsium Vaksin Dengue disiapkan oleh PBTDK Balitbangkes. Sel yang digunakan dalam proses penyiapan isolasi virus adalah sel C6/36. Media yang digunakan adalah MEM dengan FBS 10% sebagai growth medium, dan MEM dengan FBS 2% sebagai media peeliharaan. Isolasi virus dengue serotipe 1, 2, 3, dan 4 strain lokal Indonesia koleksi Balitbangkes dilakukan dengan cara inokulasi pada sel sel C6/36 kemudian virus yang tumbuh diidentifikasi dengan metode nested PCR (Lancioti).

Kultur virus dan pengukuran titer virus dapat dilihat pada gambar berikut.



Gambar 7. Hasil pengukuran titer virus (plaque assay)

Hasil yang diperoleh adalah pada strain vaksin DENV-1 genotype 1 (072) diperoleh titer lebih dari 10^3 PFU/ml dan pada isolat (073) belum terbentuk plak. Strain vaksin DENV-2 & -4 masih perlu diulang. Strain vaksin DENV-3 diperoleh titer 10^3 PFU.

Hasil serotyping yang dilakukan dapat dilihat pada Gambar sebagai berikut.



Gambar 8. Hasil elektroforesis Agarose 1% serotyping Virus Dengue metode Lanciotti

Desain primer dilakukan untuk memperoleh konstruksi gen prM/E dengue virus serotipe 1. Selanjutnya primer diuji kualitasnya menggunakan software PerlPrimer untuk menghindari adanya dimer, selain itu juga dilakukan uji insilico menggunakan *software snapgene*. Primer yang digunakan adalah primer dengan modifikasi penambahan stop kodon untuk menghindari residu asam amino lain yaitu *histidine* dan epitop c-myc. Urutan basa primer yang digunakan adalah sebagai berikut:

1. Primer cloning:

D1-072PreM/EpPICαAXho1 F (28 bs):

TAATctcgagAAAAGATTCCATTTGACTACACGAGGGGGAGAGC

Xho1 KEX-2

D1-072PreM/EpPICαANot1 R (22bs):

TAATgcggccgcCTACGCCTGAACCATGACTCCTAAG

Not1 Stop codon

2. Primer Sekuensing:

F2 D1 072 551-576 (26 basa)

CAACTTGGGTAGATGTGGTGCTGGAA

R2 D1 072 1348-1375 (28basa)

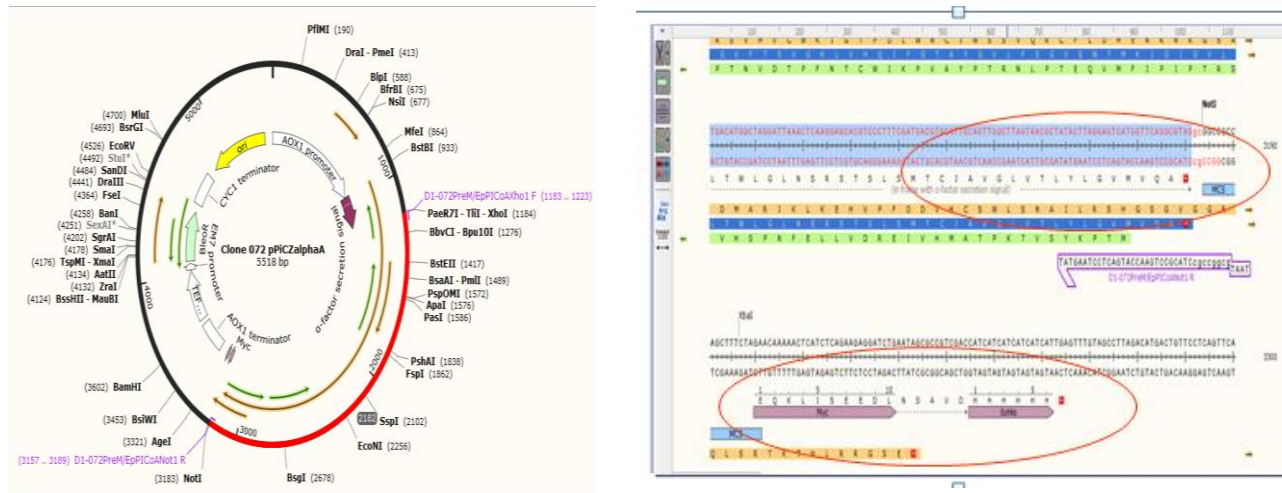
TCAGTTTGTCCATCTTTAGTCTACATT

Primer Vektor AOXI F & R

5'AOX1 : 5'GACTGGTTCCAATTGACAAGC 3'

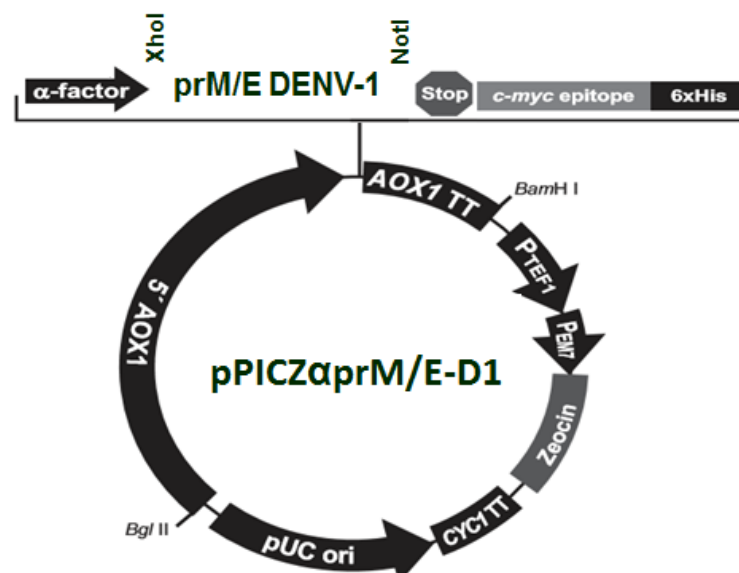
3'AOX1 : 5'GCAAATGGCATTCTGACATCC 3'.

Hasil studi insiliko kloning gen preM/E Isolat 072 D1 Genotype 1 pada plasmid pPICZ α A menggunakan primer spesifik dengan modifikasi penambahan Stop kodon dapat dilihat pada gambar 9. Protein yang dihasilkan sesuai target yakni tidak ada C-myc dan His tag.



Gambar 9. Hasil Studi Insiliko Cloning prM/E D1 d Plasmid pPICZ α A
Peta plasmid rekombinan prM/E Dengue serotipe 1, serta urutan basa dan urutan asam amino dapat dilihat pada gambar di bawah ini.

A. Peta Plasmid Rekombinan pPICZalphaA/prM/E-D1



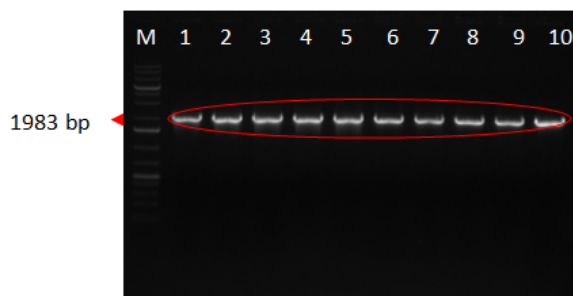
B. Urutan Basa Plasmid Rekombinan prM/E D1 (dari start codon)

```
ATGAGATTTCTTCAATTTTACTGCTGTTTATTGCGAGCATCCTCGCATTAGTCTCCAGTCAACACTACAACAGAAGATGAAACGCGACAAATTCGGCTGA
AGCTGTCTCGGTTACTCAGATTTAGAGGGGATTTGATGTTGCTGTTTGGCATTTTCCAACAGCACAAATACGGGTTATTGTTTATAATCTACTATTGCCAG
CATTGCTGCTAAGAGAGAGGGGATCTCTCGAGAAAGATTCATTTGACTACACGAGGGGGAGAGCGGCACATGATAGTCAGCAAGCAGGAAAGAGGAAAGTCT
ACTTTTGTAAAGACCTCAGCAGGTGTCAACATGTGCACCTTATAGCGATGGATTTGGAGAGTTATGTGAGGACACACTGACTTACAAATGCCCTCGAATCACTG
AGGCGGAACAGATGACGTTGATTGTTGGTGCATGCCACAGACACATGGTGACCTATGGAACATGTTCCCAACTGGCGAGCACCGACGAGACAAACGTTCCG
TCGCACTGGCCCCACAGTGGGACTTGGTTTGGAAACAAGAACCGAAACGTTGGATGTCCTCGAAGGCGCTTGGAAACAGATACAAGAGTGGAGACTTGGGCC
CTGAGACACCCAGGGTTCACGGTGATAGCCCTTTCTAGCATGTCATAGGAACATCTATCACCAGAAAGGATTATCTTCATTTGTTAATGCTGGTTACACC
ATCCATGGCCATGCGATGCGTGGGAATAGGCGAGCAGGGACTTCTGGAAGGACTGTGAGGAGCAACTTGGTATGATGTGGTGTGGAACATGGAAGTTGCGTCA
CTACCATGGCAAAAGACAAACCACTTGGACATTGAACTCTTGAAGACGGAAATCACAAACCTGCGCTCTGCGCAAACTGTGCATTGAAGCTAAAATATCAAA
CACCACCACGACTCAAGATGTCCAACAAAGGAGAACCCACACTGGTGAAGAACAAAGCGGAACTTGTGTGTCGACGAACGTTTGTGACAGAGGGCTGGG
GCAATGGCTGTGGGCTCTTTGAAAGGAAGCCTTATAACGTGTGCTAAGTTCAAGTGTGTGACGAACTGGAAGGAAATAGTTCAATATGAAACCTGAAATAT
TCAGTAATAGTCACGCTCCACACTGGAGACGAGCATCAGGTGGGAAATGAAAGCAGACAACTGGGACAACCTGCAACTATAACACCTCAAGCTCCTACGACAGAA
ATACAGCTGACCGACTACGGAGCTCTTACATTGGATTGTTTACCTAGAACAGGACTAGACTTTAATGAAATGGTGTGTTGACAATGAAAGAAAAATCATGGCTAGT
CCACAAACAAATGGTTTCTAGACCTACCACTGCCCTTGGACCTCGGGAGCTTCAACAAACAGAGACTTGGAAACAGACAAAGATTGCTGGTGAATTAAGACAGCT
CATGCAAGAGAGCAGGAAGTGTGCTACTAGGATCACAAGAGGAGCAATGCAACTGCGCTGACCGAGCGACGGAATCCAAACGCTCTGGAACGACAAACATTT
TTTGACGACACTTGAATGTAGCTAAAGATGGACAACTGACTCTAAAAGGATGTATATGTGATGTGACAGGCTCATTCAAGCTAGAGAAAGAGTGGCTG
AGACCCAGCATGGAACGCTTCTAGTGCAGATTAAATACGAAGGAACAGATGCACCATGCAAGATCCCTTTTGGACCAAGATGAAAGAGGAGTAAACCCAGATGG
GAGATTGATAACAGCCCAACCCATAGTCACTGACAAAGAAACCAAGTCAACATTGAGGCGAAGCCGCTTTTGGTGAGAGTTACATGCTGATAGGAGCAGGTGAA
AAAGCTTTGAACTAAGCTGTTTCAAGAAAGGAAGCAGCATAGGGAAATGTTTGAAGCACTGCCAGAGGAGCAGCAAGGATGCCATCTGGGAGACACCGCA
TGGGACTTTGGTTCTATAGGAGGAGTGTTCACGTCTGTTGGAAATTTGGTACACAGATCTTTGAACTGCATATGGAGTTCTGTTGAGCGGTGTTTCTGGACCA
TGAATAAGGAATAGGGGTTTGGCTGACATGGCTAGGATTAACTCAAGGAGCAGTCCCTTTGATGACGTGCATGCAGTTGGCTAGTAAACGCTATACCTAGGA
GTCATGGTTCAGGCGTGAGCGGCCGCCAGCTTCTAGACAAAACTATCTCAGAAGAGGATCTGAATAGCGCCGTCGACCATCATCATCATCATTTGA
```

C. Urutan Asam Amino Plasmid Rekombinan prM/E D1 (dari start codon)

```
MRFPSIFTAVLFAASSALAAPVNTTTEDETAQIPAEVIGYSDLEGDFDVAVLFPNSTNNGLLFINTTASIAAKEEGVSLEKRFHLTTRGGEPHMMVSKQ
ERKSLFLKTSAGVNMCTLIAMDGLCEDTLTYKCPRIEAEPDDVDCWNCNATDWTVYGTCSQTGEHRRDKRSVALAPHVGLGLETRTETWMSSE
GAWKQIQRVETWALRHPGFTVIALFLAHTSITQKGIIFILLMLVTPSMAAMRCVIGSRDFVEGLSGATWVDVVLEHSGCVTTMAKDPTLIDELLKTE
VTNPVAVLRKLCIEAKISNTTDSRCPTQGEATLVEEQDANFVCRRTFVDRGWNGCGLFGKGLSITCAKFKCVTKLEGKIVQYENLKYSVIVTVHTGDQ
HQVGNESSTEHTATITPOAPTTEIQLTDYGALTLDSPRTGLDFNEMVLLTMKEKSWLVHKQWFLDPLPWTSASTTGETWNRQDLLVTFKTAHAK
KQEVVVLGSQEGAMHTALTGATEIQTSGTTTIFAGHLKCRCLKMDKLTGKMSYVMCTGSKLEKEVAETQHGTVLVQIKYE GTDAPCKIPFSTQDEKGV
TQNGRLITANPNVDKEKPNVIEAEPFGE SYIVIGAGEKALKSWFKKSSIGKMF EATARGARRMAILGDTAWDFGSGIGVFTSVGKLHVIQIFGTAYGV
LFSGVSWTMKIGIVLLTWLGLNSRSTSLSMTCXAVGLVTLVGLVMVQA*AAASFLEQKLISEEDLSAVDHHHHHH*
```

Amplifikasi gen prM/E DENV-1 dengan teknik PCR menggunakan pasangan primer yaitu pasangan primer *forward* dan *reverse* spesifik untuk cloning sesuai tabel diatas. Kedua primer di desain memiliki situs restriksi yakni enzim *XhoI* primer *forward* dan enzim *NotI* pada primer *reverse*. Hasil konstruksi gen prM/E DENV-1 dapat dilihat pada gambar 10.



Urutan sumur atas:

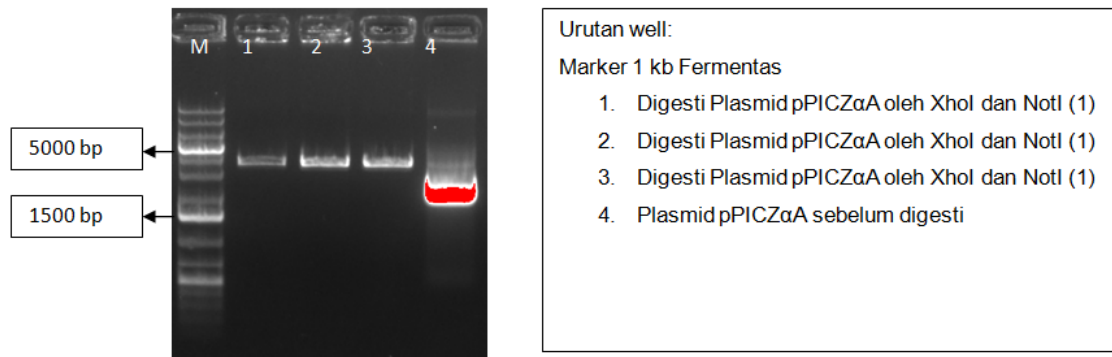
Marker 1 kb plus Fermentas

1. PCR prM/E isolate 072 primer dengan stop kodon (1)
2. PCR prM/E isolate 072 primer dengan stop kodon (2)
3. PCR prM/E isolate 072 primer dengan stop kodon (3)
4. PCR prM/E isolate 072 primer dengan stop kodon (4)
5. PCR prM/E isolate 072 primer dengan stop kodon (5)
6. PCR prM/E isolate 072 primer dengan stop kodon (6)
7. PCR prM/E isolate 072 primer dengan stop kodon (7)
8. PCR prM/E isolate 072 primer dengan stop kodon (8)
9. PCR prM/E isolate 072 primer dengan stop kodon (9)
10. PCR prM/E isolate 072 primer dengan stop kodon (10)

Gambar 10. Visualisasi hasil konstruksi gen prM/E dengue virus serotipe 1 isolat 072 pada gel agarose 1 %

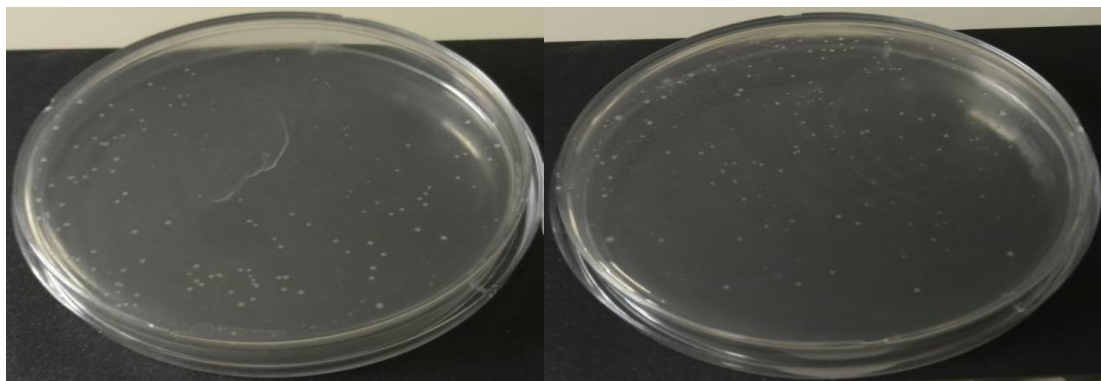
Gen sisipan prM/E DENV-1 dan plasmid pPICZαA yang telah disiapkan sebelumnya dipotong menggunakan 2 buah enzim restriksi yang ditambahkan pada primer pengamplifikasi gen sisipan. Enzim tersebut adalah enzim *XhoI* (Fermentas) dan *NotI* (Fermentas). Verifikasi hasil pemotongan dengan enzim restriksi pada prM/E dan plasmid pPICZαA, diidentifikasi dengan proses elektroforesis pada gel agarose 1% dan divisualisasi

dengan Etidium Bromide untuk memastikan pemotongan berjalan sempurna. Hasil pemotongan sempurna diperlihatkan dengan pita DNA yang hasilnya hanya 1 pita, artinya DNA berbentuk linier.



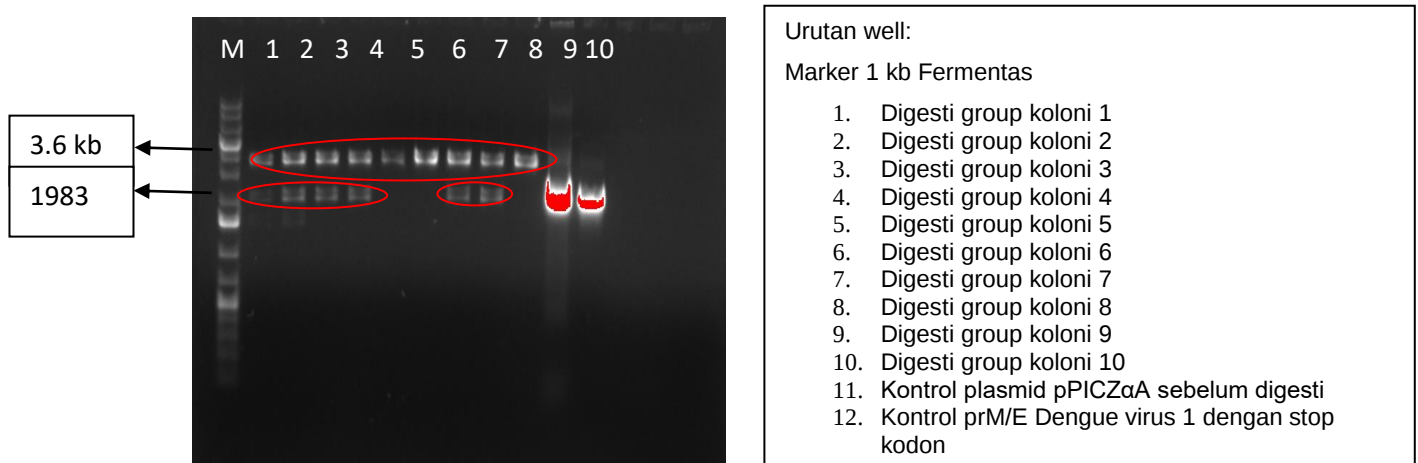
Gambar 11. Hasil pemotongan vektor dengan enzim restriksi XhoI dan NotI

Kemudian dilakukan transformasi ke sel kompeten *E. Coli* Top 10F. Hasil transformasi plasmid rekombinan di media LB Agar + Zeocin 25 ug/ml dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 16-18 jam dapat dilihat pada gambar 12.



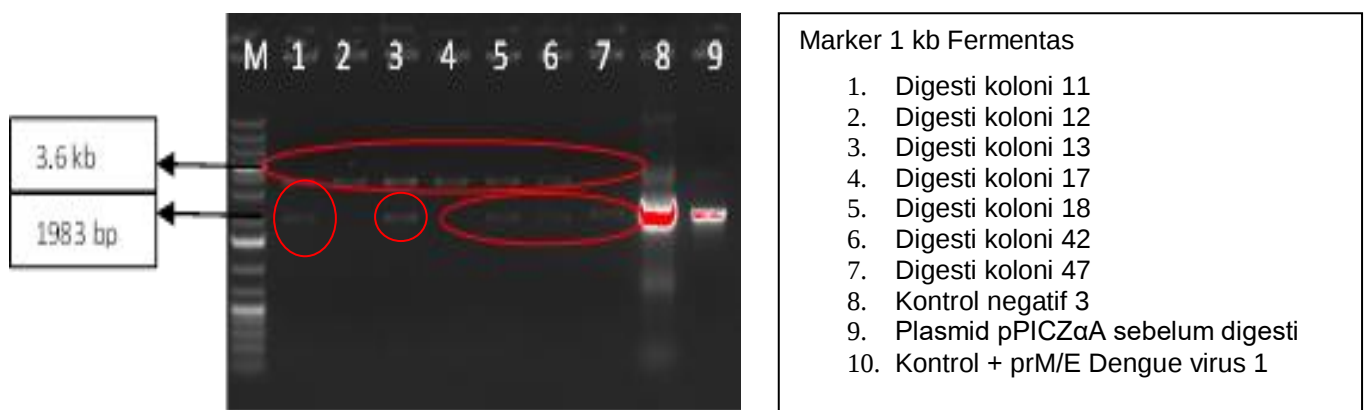
Gambar 12. Hasil transformasi plasmid rekombinan prM/E DENV-1 dengan modifikasi stop kodon

Konfirmasi pertama dilakukan dengan pemotongan plasmid rekombinan menggunakan enzim restriksi XhoI dan NotI. Hasil cloning gen prM/E merupakan fusi dengan plasmid pPICZαA, sehingga apabila gen prM/E berhasil tersisip dengan orientasi yang benar akan dihasilkan 2 potongan pita DNA berukuran sekitar 3,6 kb dan 1.983 bp pada visualisasi gel agarose 1% dengan etidium bromide. Hasil yang diperoleh sebagai berikut.



Gambar 13. Hasil verifikasi plasmid rekombinan grouping dengan metode digesti XhoI dan NotI

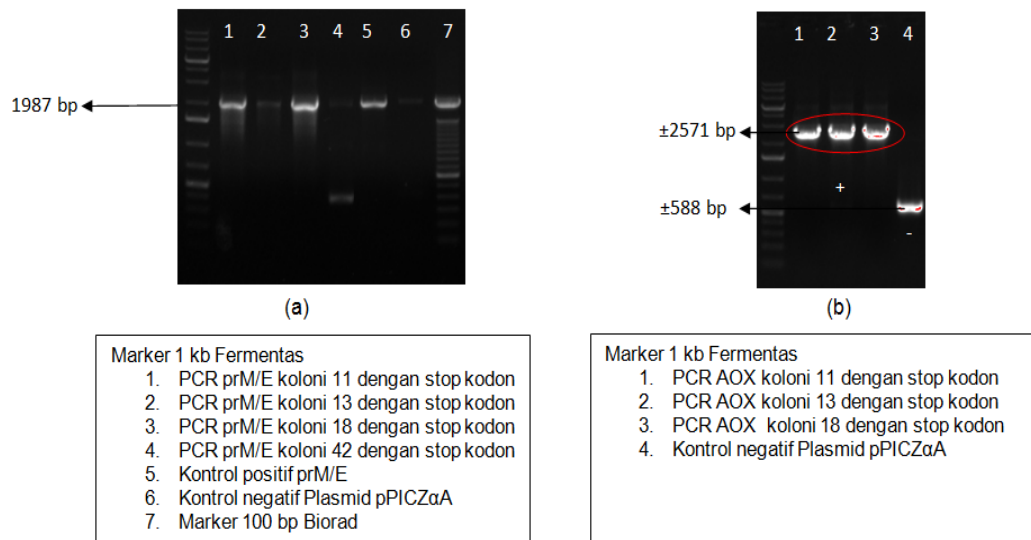
Dari hasil verifikasi pemotongan dengan enzim restriksi dapat diperoleh grup yang positif memiliki plasmid rekombinan. Kemudian dilakukan konfirmasi pada koloni tunggal anggota group yang positive. Metode yang digunakan adalah dengan pemotongan plasmid rekombinan menggunakan enzim restriksi XhoI dan NotI. Hasil cloning gen prM/E merupakan fusi dengan plasmid pPICZαA, sehingga apabila gen prM/E berhasil tersisip dengan orientasi yang benar akan dihasilkan 2 potongan pita DNA berukuran sekitar 3,6 kb dan 1.983 bp pada visualisasi gel agarose 1% dengan etidium bromide. Hasil yang diperoleh sebagai berikut.



Gambar 14. Hasil verifikasi plasmid rekombinan dengan metode digesti XhoI dan NotI

Verifikasi selanjutnya dengan metode PCR plasmid rekombinan primer spesifik gen prM/E, dan menggunakan primer plasmid pPICZαA untuk mengetahui kebenaran orientasi sisipan. Apabila gen prM/E berhasil tersisip dengan orientasi yang benar menggunakan pasangan primer prM/E akan dihasilkan 1 potongan pita DNA berukuran sekitar 1983 kb, sedangkan dengan pasangan primer AOX akan dihasilkan 2 potongan pita DNA berukuran

sekitar 2571 kb. Untuk kontrol negatif diperoleh ukuran pita pada 588 bp. Hasil yang diperoleh sebagai berikut.



Gambar 15. Hasil verifikasi plasmid rekombinan dengan metode PCR dengan primer spesifik prM/E (a) dan primer spesifik AOX (b)

Nomor koloni yang terpilih dari verifikasi dengan metode enzim restriksi dan metode PCR primer spesifik AOX dan prM/E adalah koloni nomor 11. Kemudian koloni ini diverifikasi kembali urutan basanya dengan metode sekuensing. Hal ini dilakukan untuk melihat orientasi sama dengan referensi sekuens. Hasil sekuensing dapat dilihat di bawah ini. Urutan basa untuk koloni 11 hasil sekuensing dari start kodon sampai stop kodon tanpa his tag.

```

ATGAGATTTTCCTTCAATTTTTTACTGCTGTTTTATTTCGCAGCATCCTCCGCATTAGCTGCTCCAGTCAACACTACA
ACAGAAGATGAAACGGCACAAATTCGGCTGAAGCTGTTCATCGGTTACTCAGATTTAGAAAGGGGATTTTCGATGTT
GCTGTTTTTGCCATTTTCCACAGCACAAATAACGGGTATTGTTTATAAATACCTACTATTGCCAGCATTGCTGCCT
AAAGAAGAAGGGGTATCTCTCGAGAAAAGATTCCATTTGACTACACGAGGGGGAGAGCCGCACATGATAGTTCAGC
AAGCAGGAAAGAGGAAAGTCACTTTGTTTAAGACCTCAGCAGGTGTCAACATGTGCAACCTTATAGCGATGGAT
TTGGGAGAGTTATGTGAGGACACACTGACCTTACAAATGCCCTCGAATCACTGAGGCGGAACAGATGACGTTGAT
TGTTGGTGCAATGCCACAGACACATGGGTGACCTATGGAACATGTTCCCAACTGGCGAGCACCGACGAGACAAA
CGTTCCTCGTCGACTGGCCCCACAGTGGGACCTTGGTTTGGAAACAAGAACCGAAACGTGGATGTCTCCGAAGGC
GCTTGGAACAGATACAAAGAGTGGAGACTTGGGCCCTGAGACACCCAGGGTTCACGGTGATAGCCCTTTTCTA
GCACATGCCATAGGAACATATCACCCAGAAAGGATTTATCTTCATTTTGTAAATGCTGGTTACACCATCCATG
GCCATGCGATGCGTGGGAATAGGCAGCAGGGACTTCGTGGAAGGACTGTCAGGAGCAACTTGGGTAGATGTGGTG
CTGGAACATGGAAGTTGCGTCACTACCATGGCAAAAGACAAACCAACATTGGACATTGAACTCTTGAAGACGGAA
GTCACAAACCCCTGCCGTCTGCGCAAACTGTGCATTGAAGCTAAAAATATCAAAACACCACCACCGACTCAAGATGT
CCAACACAAGGAGAAGCCACACTGGTGGAAGAAACAAGACGCGAACTTTGTGTGTCGACGAACGTTTGTGGACAGA
GGCTGGGGCAATGGCTGTGGGCTCTTTGGAAGGAAGCCTTATAACGTGTGCTAAGTTCAAGTGTGTGACGAAA
CTGGAAGGAAAAATAGTTCAATATGAAAACTTGAAATATTCAGTAATAGTCAACCGTCCACACTGGAGACCAGCAT
CAGGTGGGAAATGAAAGCACAGAACATGGGACAACTGCAACTATAACACCTCAAGCTCCTACGACAGAAATACAG
CTGACCGACTACGGAGCTCTTACATTGGATTGTTCACCTAGAACAGGACTAGACTTTAATGAAATGGTGTGTTG
ACAATGAAAGAAAAATCATGGCTAGTCCACAAACAATGGTTTCTAGACCTACCACTGCCCTTGGACCTCGGGAGCT
TCAACAACACAAGAGACTTGGAAACAGACAAGATTGCTGGTGACATTTAAGACAGCTCATGCAAAGAAGCAGGAA
GTAGTCGTACTAGGATCAACAAGAGGAGCAATGCACACTGCGCTGACCGGAGCGACGGAAATCCAAACGTCCTGGA
ACGACAACAATTTTTTGAGGACACTTGAAATGTAGACTAAAGATGGACAACTGACTCTAAAAGGGATGTCTATAT
GTGATGTGTCACAGGCTCATTTCAAGCTAGAGAAAGAAGTGGCTGAGACCCAGCATGGAACCGTTCTAGTGCAGATT

```

AAATACGAAGGAACAGATGCACCATGCAAGATCCCTTTTTTCGACCCAAGATGAAAAAGGAGTAACCCAGAATGGG
AGATTGATAACAGCCAACCCCATAGTCACTGACAAAGAAAAACCAGTCAACATTGAGGCAGAACCGCCTTTTGGT
GAGAGTTACATCGTGATAGGAGCAGGTGAAAAAGCTTTGAAACTAAGCTGGTTCAAGAAAGGAAGCAGCATAGGG
AAAAATGTTTGAGGCAACTGCCAGAGGAGCACGAAGGATGGCCATACCTGGGAGACACCGCATGGGACCTTTGGTTCT
ATAGGAGGAGTGTTACGTTCTGTTGGAAAAATTGGTACACCAGATCTTTGGAACTGCATATGGAGTTCTGTTCAGC
GGTGTTCCTGGACCATGAAAAATAGGAATAGGGGGTCTGCTGACATGGCTAGGATTAACTCAAGGAGCACGTCC
CTTTCGATGACGTGCATGCAGTTGGCTTAGTAACGCTATACCTTAGGAGTCATGGTTCAGGCGTGCGGGCCCA
GCTTCTAGAACAAAACTCATCTCAGAAGAGGATCTGAATAGCGCGTCGACCATCATCATCATCATCTGA

Hasil urutan basa koloni 11 yang diperoleh kemudian dibandingkan dengan reference sequence dan diperoleh hasil kemiripan 100 %. Hasil yang ditunjukkan adalah sebagai berikut.

Reference sequence	10 20 30 40 50 60 70
plasmid rekombinan koloni 11	ATGAGATTTCCTTCAATTTTTACTGCTGTTTTATTGCGAGCATCCTCCGCATTAGTGTCTCCAGTCAACACT ATGAGATTTCCTTCAATTTTTACTGCTGTTTTATTGCGAGCATCCTCCGCATTAGTGTCTCCAGTCAACACT
Reference sequence	110 120 130 140 150 160 170
plasmid rekombinan koloni 11	CGGCTGAAGCTGTCTCGGTTACTCAGATTTAGAAGGGGATTTGATGTTGCTGTTTTGCCATTTTCCAACA CGGCTGAAGCTGTCTCGGTTACTCAGATTTAGAAGGGGATTTGATGTTGCTGTTTTGCCATTTTCCAACA
Reference sequence	210 220 230 240 250 260 270
plasmid rekombinan koloni 11	TACTACTATTGCCAGCATTGCTGCTAAAGAAGAGGGGTATCTCTCGAGAAAAGATTCCATTTGACTACACG TACTACTATTGCCAGCATTGCTGCTAAAGAAGAGGGGTATCTCTCGAGAAAAGATTCCATTTGACTACACG
Reference sequence	310 320 330 340 350 360 370
plasmid rekombinan koloni 11	AAGCAGGAAAGAGGAAAGTCACTTTTGTAAAGACCTCAGCAGGTGTCAACATGTGCACCCCTTATAGCGATG AAGCAGGAAAGAGGAAAGTCACTTTTGTAAAGACCTCAGCAGGTGTCAACATGTGCACCCCTTATAGCGATG
Reference sequence	410 420 430 440 450 460 470
plasmid rekombinan koloni 11	TGACTTACAAATGCCCTCGAATCACTGAGGCGGAACCCAGATGACGTTGATTGTTGGTGCAATGCCACAGACA TGACTTACAAATGCCCTCGAATCACTGAGGCGGAACCCAGATGACGTTGATTGTTGGTGCAATGCCACAGACA
Reference sequence	510 520 530 540 550 560 570
plasmid rekombinan koloni 11	AACCTGGCGAGCACCGACGAGACAAACGTTCCGTCGCACCTGGCCCCACACGTGGGACTTGGTTTGAAACCAAG AACCTGGCGAGCACCGACGAGACAAACGTTCCGTCGCACCTGGCCCCACACGTGGGACTTGGTTTGAAACCAAG
Reference sequence	610 620 630 640 650 660 670
plasmid rekombinan koloni 11	GCTTGAAACAGATACAAAGAGTGGAGACTTGGGCCCTGAGACACCCAGGGTTACGGTGATAGCCCTTTTT GCTTGAAACAGATACAAAGAGTGGAGACTTGGGCCCTGAGACACCCAGGGTTACGGTGATAGCCCTTTTT
Reference sequence	710 720 730 740 750 760 770
plasmid rekombinan koloni 11	CCCAGAAAGGGATTATCTTTCATTTTGTTAATGCTGGTTACACCATCCATGGCCATGCGATGCGTGGGAATAG CCCAGAAAGGGATTATCTTTCATTTTGTTAATGCTGGTTACACCATCCATGGCCATGCGATGCGTGGGAATAG
Reference sequence	810 820 830 840 850 860 870
plasmid rekombinan koloni 11	AGGAGCAACTTGGGTAGATGTGGTCTGGAAACATGGAAGTTGCGTCCTACCATGGCAAAAGACAAACCAAC AGGAGCAACTTGGGTAGATGTGGTCTGGAAACATGGAAGTTGCGTCCTACCATGGCAAAAGACAAACCAAC
Reference sequence	910 920 930 940 950 960 970
plasmid rekombinan koloni 11	GTCACAAAACCTGCCGTCTGCGCAAACTGTGCATTGAAGCTAAAATATCAAAACCCACCACCGACTCAAGA GTCACAAAACCTGCCGTCTGCGCAAACTGTGCATTGAAGCTAAAATATCAAAACCCACCACCGACTCAAGA
Reference sequence	1010 1020 1030 1040 1050 1060 1070
plasmid rekombinan koloni 11	TGGAAGAACAAAGACGCGAACTTTGTGTGTCGACGAACGTTTGTGGACAGAGGCTGGGGCAATGGCTGTGGGC TGGAAGAACAAAGACGCGAACTTTGTGTGTCGACGAACGTTTGTGGACAGAGGCTGGGGCAATGGCTGTGGGC
Reference sequence	1110 1120 1130 1140 1150 1160 1170
plasmid rekombinan koloni 11	TGCTAAGTTCAAGTGTGTGACGAACTGGAAGGAAAAATAGTTCAATATGAAAACTTGAAATATTCAGTAAT TGCTAAGTTCAAGTGTGTGACGAACTGGAAGGAAAAATAGTTCAATATGAAAACTTGAAATATTCAGTAAT
Reference sequence	1210 1220 1230 1240 1250 1260 1270
plasmid rekombinan koloni 11	CAGGTGGGAAATGAAAGCACAGAACATGGGCAACTGCAACTATAACACCTCAAGTCTCTACGACAGAAATA CAGGTGGGAAATGAAAGCACAGAACATGGGCAACTGCAACTATAACACCTCAAGTCTCTACGACAGAAATA
Reference sequence	1310 1320 1330 1340 1350 1360 1370
plasmid rekombinan koloni 11	TGGATTGTTCACTTAGAACAGGACTAGACTTTAATGAAATGGTGTGTGACAAATGAAAGAAAAATCATGGC TGGATTGTTCACTTAGAACAGGACTAGACTTTAATGAAATGGTGTGTGACAAATGAAAGAAAAATCATGGC
Reference sequence	1410 1420 1430 1440 1450 1460 1470
plasmid rekombinan koloni 11	ACCCTGCCTTGGACCTCGGGAGCTTCAACAACACAGAGACTTGGAAACAGACAAGATTTGCTGGTGACATT ACCCTGCCTTGGACCTCGGGAGCTTCAACAACACAGAGACTTGGAAACAGACAAGATTTGCTGGTGACATT

```

      1510      1520      1530      1540      1550      1560      1570
Reference sequence      ....|....|....|....|....|....|....|
plasmid rekombinan koloni 11 GTAGTCGTACTAGGATCACAAAGAGGAGCAATGCACACTGCGCTGACCGGAGCGACGGAAATCCAAACGTCT

      1610      1620      1630      1640      1650      1660      1670
Reference sequence      ....|....|....|....|....|....|....|
plasmid rekombinan koloni 11 TGAAATGTAGACTAAAGATGGACAAACTGACTCTAAAAGGGATGTCATATGTGATGTGCACAGGCTCATTCA

      1710      1720      1730      1740      1750      1760      1770
Reference sequence      ....|....|....|....|....|....|....|
plasmid rekombinan koloni 11 GCATGGAACCGTTCTAGTGCAGATTAAATACGAAGGAACAGATGCACCATGCAAGATCCCTTTTTCGACCCA

      1810      1820      1830      1840      1850      1860      1870
Reference sequence      ....|....|....|....|....|....|....|
plasmid rekombinan koloni 11 AGATTGATAACAGCCAAACCCCATAGTCACTGACAAAGAAAAACAGTCAACATTGAGGCAGAACCGCCTTTT

      1910      1920      1930      1940      1950      1960      1970
Reference sequence      ....|....|....|....|....|....|....|
plasmid rekombinan koloni 11 GTGAAAAAGCTTTGAAACTAAGCTGGTTCAAGAAAGGAAGCAGCATAGGGAAAAATGTTTGAGGCAACTGCCA

      2010      2020      2030      2040      2050      2060      2070
Reference sequence      ....|....|....|....|....|....|....|
plasmid rekombinan koloni 11 AGACACCGCATGGGACTTTGGTTCTATAGGAGGAGTGTTACGTCGTGTTGGAAAAATTGGTACACCAGATCTT

      2110      2120      2130      2140      2150      2160      2170
Reference sequence      ....|....|....|....|....|....|....|
plasmid rekombinan koloni 11 GGTGTTTCTTGACCATGAAAATAGGAATAGGGGTTCTGCTGACATGGCTAGGATTAAACTCAAGGAGCAGC

      2210      2220      2230      2240      2250      2260      2270
Reference sequence      ....|....|....|....|....|....|....|
plasmid rekombinan koloni 11 GCTTAGTAACGCTATACCTTAGGAGTCATGGTTCAGGCGTGAGCGGCCGCCAGCTTTCTAGAACAAAACTCA

      2310      2320
Reference sequence      ....|....|
plasmid rekombinan koloni 11 CGACCATCATCATCATCATATTGA

```

Selain dilihat urutan basa nya, verifikasi dilakukan dengan melihat urutan asam amino pada koloni 11. Hasil dapat dilihat di bawah ini.

```

MRFPSIFTAVLFAASSALAAPVNTTTEDETAQIPAEAVIGYSDLEGFDDVAVLPFSNSTNNGLLFINTTIIASIAA
KEEGVS[EKRFLHTTRGGEPHMIVSKQERGKSLLFKTSAGVNMCTLIAMD LGELCEDTLTYKCPRITEAEPDDVD
CWCNATDTWVTYGTCSQTGEHRRDKRSVALAPHVGLGLETRTETWMSSEGAWKQIQRVETWALRHPGFTVIALFL
AHAIGTSITQKGIIFILLMLVTPSMAMRCVIGISRDFVEGLSGATWVDVVLEHGS CVTTMAKD KPTLDIELLKTE
VTNPAVLRLKLCIEAKISNTTDSRCPTQGEATLVEEQDANFVCRRTFVDRGWNGCGLFGKGS LITCAKFKCVTK
LEGKIVQYENLKYSVIVTVHTGDQHQVGNESTEHEGTTATITPQAPTTEIQLTDY GALTLD C SPRTGLDFNEMVLL
TMKEKSWLVHKQWFLDLPLPWTSGASTTQETWNRQDLLVTFKTAHAKKQEVVVLGSQEGAMHTALTGATEIQTSG
TTTIFAGHLKRLKMDKLT LKGMSYVMCTGSFKLEKEVAETQHGTVLVQIKYEGTDAPCKIPFSTQDEKGVTONG
RLITANPIVTDKEKPVNIEAEPFGE SYIVIGAGEKALKLSWFKKGSSIGKMF EATARGARRMAILGDTAWDFGS
IGGVFTSVGKLVHQIFGTAYGVLFSGVSWTMKIGIGVLLTWLGLNSRSTSLSMT CXAVGLVTLYLGMVQ[*]AAA
SFLEQKLISEEDLNSAVDHHHHHH*

```

Hasil urutan asam amino kemudian dibandingkan dengan urutan asam amino referensi. Hasil diperoleh kesamaan urutan asam amino antara koloni 11 dengan referensi sebanyak 100 %. Hasil dapat dilihat pada gambar berikut.

```

      10      20      30      40      50      60      70
Reference sequence MRFPSIFTAVLFAASSALAAPVNTTTEDETAQIPAEAVIGYSDLEGDFDVAVLPFSNSTNNGLLFINTTIAS
plasmid rekombinan koloni 11 MRFPSIFTAVLFAASSALAAPVNTTTEDETAQIPAEAVIGYSDLEGDFDVAVLPFSNSTNNGLLFINTTIAS

      110     120     130     140     150     160     170
Reference sequence KQERGKSLLFKTSAGVNMCTLIAMDLGELCEDTLTYKCFRITAEAPDDVDCWCNATDTWVTYGTCSQITGEHR
plasmid rekombinan koloni 11 KQERGKSLLFKTSAGVNMCTLIAMDLGELCEDTLTYKCFRITAEAPDDVDCWCNATDTWVTYGTCSQITGEHR

      210     220     230     240     250     260     270
Reference sequence ANKQIQRVETWALRHPGFTVIALFLAHAIGTSITQKGIIFILLMLVTPSMAMRCVIGISRD FVEGLSGATWV
plasmid rekombinan koloni 11 ANKQIQRVETWALRHPGFTVIALFLAHAIGTSITQKGIIFILLMLVTPSMAMRCVIGISRD FVEGLSGATWV

      310     320     330     340     350     360     370
Reference sequence VTNPAVLRKLCIEAKISNTTIDSRCPQTGEATLVEEQDANFVCRRTFVDRGWNGCGLFGKGSLLITCAKFKC
plasmid rekombinan koloni 11 VTNPAVLRKLCIEAKISNTTIDSRCPQTGEATLVEEQDANFVCRRTFVDRGWNGCGLFGKGSLLITCAKFKC

      410     420     430     440     450     460     470
Reference sequence QVGNESTEHGTTATITPQAPTTEIQLTDYGALTLDSCSPRTGLDFNEMVLLTMKEKSWLVHKQWFLDPLPWT
plasmid rekombinan koloni 11 QVGNESTEHGTTATITPQAPTTEIQLTDYGALTLDSCSPRTGLDFNEMVLLTMKEKSWLVHKQWFLDPLPWT

      510     520     530     540     550     560     570
Reference sequence VVVLGSQEGAMHTALTGATEIQTSGTTTTIFAGHLKCRKMDKLTLLKMSYVMCTGSFKLEKEVAETQHGTVL
plasmid rekombinan koloni 11 VVVLGSQEGAMHTALTGATEIQTSGTTTTIFAGHLKCRKMDKLTLLKMSYVMCTGSFKLEKEVAETQHGTVL

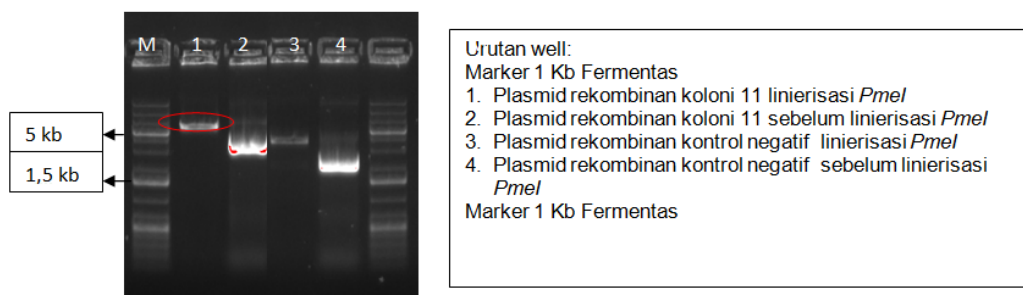
      610     620     630     640     650     660     670
Reference sequence RLITANPIVIDKEKFPVNI EAEPFGE SYIVIGAGEKALKLSWFKKGSSIGKMF EATARGARRMAILGDTAWD
plasmid rekombinan koloni 11 RLITANPIVIDKEKFPVNI EAEPFGE SYIVIGAGEKALKLSWFKKGSSIGKMF EATARGARRMAILGDTAWD

      710     720     730     740     750     760     770
Reference sequence GVSWTMKIGIGVLLTWLGLNSRSTLSMTCAVGLVTLTYLGVMVQA*AAASFLEQKLISEEDLNSAVDHHHH
plasmid rekombinan koloni 11 GVSWTMKIGIGVLLTWLGLNSRSTLSMTCAVGLVTLTYLGVMVQA*AAASFLEQKLISEEDLNSAVDHHHH

```

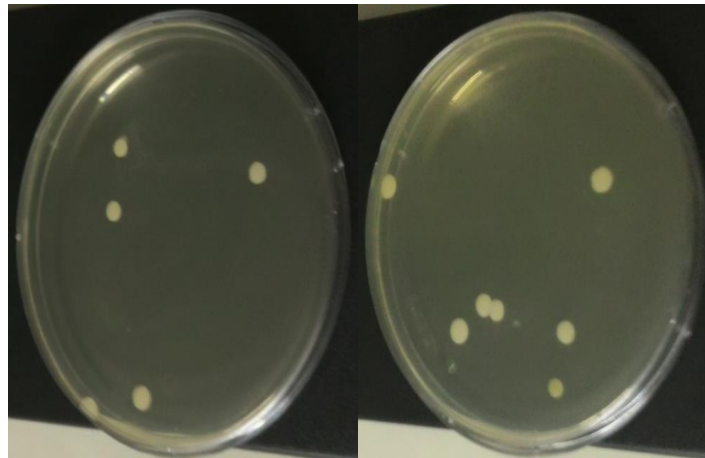
Sekuensing lengkap gen insert (~2 kb) menggunakan primer AOX1 & 2 pasang primer prM/E DENV-1 menunjukkan hasil: gen insert yang dicloning sesuai/sama dengan referensi (isolat DENV Indonesia 072) tidak ada perubahan basa saat terinsersi ke vektor (tdk ada delesi, insersi atau frame shift).

Plasmid rekombinan yang sudah dikonfirmasi keberadaan dan kebenaran orientasi insert yakni koloni 11 untuk plasmid rekombinan pPICZαA/prM/E, kemudian dilinearisasi dengan enzim *PmeI* untuk efisiensi proses transformasi. Pita yang diperoleh dari hasil linierisasi yakni untuk plasmid rekombinan ukurannya ± 5600 bp, dan kontrol negatif yang tidak mengandung insert prM/E adalah pada ukuran 3,6 kb. Hasil linierisasi dapat dilihat pada gambar 16.



Gambar 16. Hasil linierisasi plasmid rekombinan prM/E virus dengue serotipe 1

Plasmid rekombinan koloni 11 dan kontrol negatif pPICZ α A ditransformasi ke sel kompeten *Pichia pastoris* GS115 menggunakan metode electroporator (Bio-Rad Gene Pulser). Hasil dapat dilihat pada gambar 17.



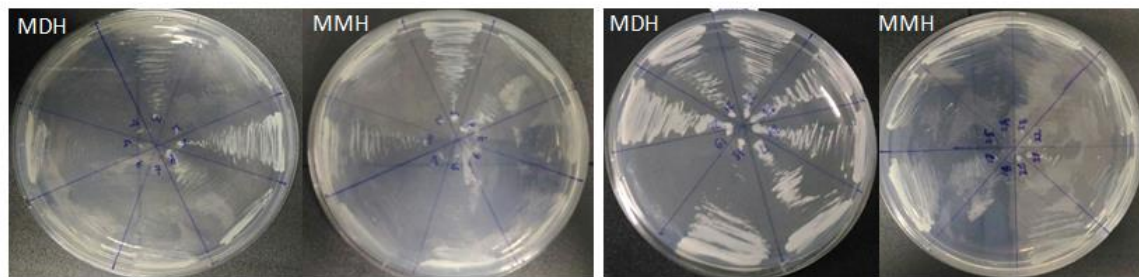
Gambar 17 Koloni *Pichia pastoris* rekombinan prM/E dengan modifikasi stop kodon

Strain GS115 dapat menghasilkan Mut⁺ dan Mut^S sehingga untuk mendapatkan Mut⁺ dilakukan pengujian pada media agar MDH dan MMH. Strain GS115 memerlukan Histidin 0,004% ketika ditumbuhkan pada minimal media. Fenotip Mut⁺ adalah jika strain tumbuh dengan normal pada kedua plate sedangkan Mut^S adalah jika strain tumbuh pada media MDH namun tidak tumbuh pada media MMH. Hasil yang diperoleh dapat dilihat pada gambar dan tabel 5. Sebagian besar klon yang dihasilkan memiliki fenotip Mut⁺.

Tabel 5 Hasil identifikasi fenotif Mut pada transforman *P. pastoris* rekombinan prM/E

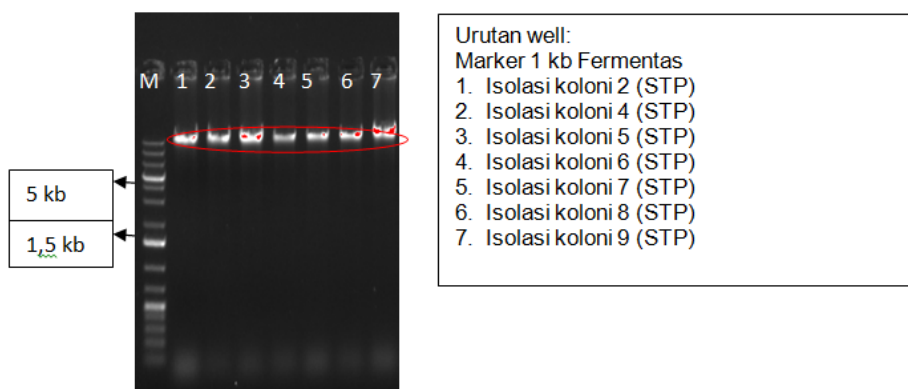
Dengan Modifikasi Stop kodon	Nomor Koloni	MDH	MMH	Interpretasi
	2	++	+	Mut ⁺
	3	±	++	Mut ^S
	4	++	-	Mut ^S
	5	+	+	Mut ⁺
	6	±	±	Mut ⁺
	7	+	±	Mut ⁺
	8	+	+	Mut ⁺
	9	++	++	Mut ⁺
	10	-	-	Mut ^S
	11	++	++	Mut ⁺
	12	++	+	Mut ⁺
	13	++	+	Mut ⁺

14	++	+	Mut ⁺
15	++	+	Mut ⁺
16	++	±	Mut ⁺
17	++	+	Mut ⁺
18	++	+	Mut ⁺
19	-	-	Mut ^S
20	++	+	Mut ⁺
21	++	+	Mut ⁺
22	++	+	Mut ⁺
23	++	+	Mut ⁺
24	++	+	Mut ⁺
25	++	+	Mut ⁺



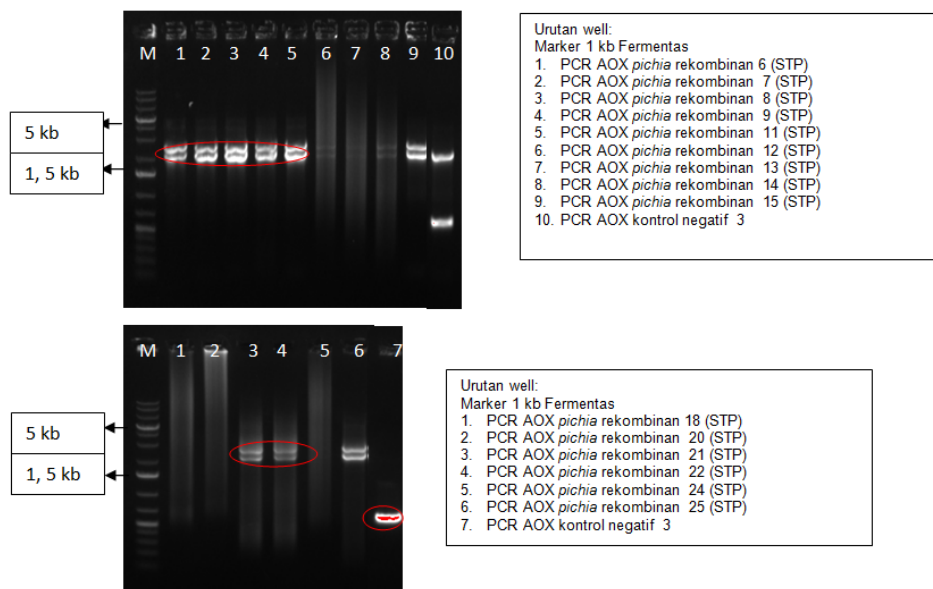
Gambar 18 Hasil identifikasi fenotif Mut pada medium MDH dan MMH

Koloni tunggal dikultur pada medium YPD (Yeast Extract Peptone Dextrose Medium) dengan campuran 1% yeast extract (oxoid, 416451), 2% peptone (Himedia, cat. 91249-500 g lot no. BCBP8880), 2% dextrose (RM016-500 G lot no. 0000043079) yang mengandung 100 µg/mL zeocin. Kemudian diinkubasi pada suhu 28°C selama overnight dengan shaker 250 rpm. Selanjutnya dilakukan isolasi DNA genome manual di *Pichia pastoris*. Hasil isolasi DNA genome *Pichia* dapat dilihat pada gambar 19.



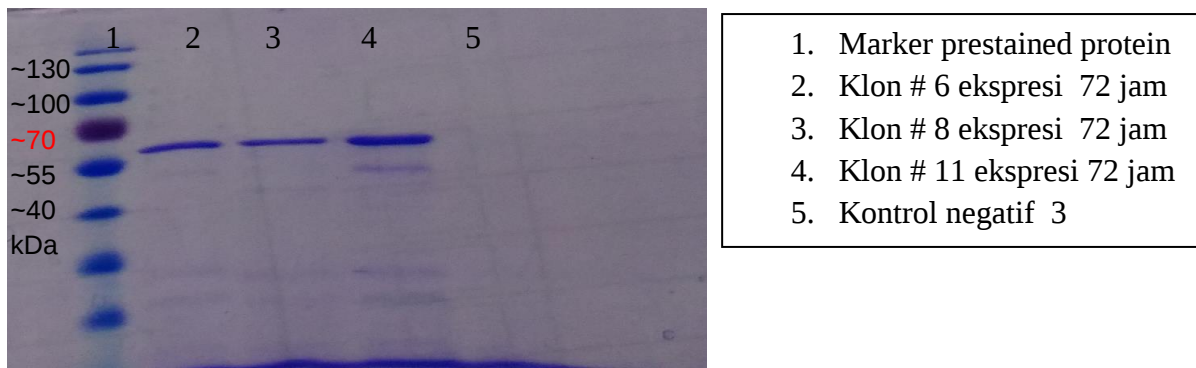
Gambar 19 Hasil isolasi manual DNA genom *Pichia* rekombinan

Identifikasi transformant plasmid rekombinan di *Pichia pastoris* dilakukan dengan PCR menggunakan primer spesifik AOX. Hasil identifikasi dengan primer AOX apabila mengandung plasmid rekombinan hasilnya akan diperoleh dua pita yakni pita DNA prM/E dengan ukuran 2.600 pb dan pita gen AOX1 pada ukuran kurang lebih 2.200 pb. Hasil PCR kemudian dianalisis dengan elektroforesis gel agarose 1%. Dilanjutkan dengan visualisasi *GelDoc*. Hasil PCR dengan AOX dapat dilihat pada gambar berikut ini.



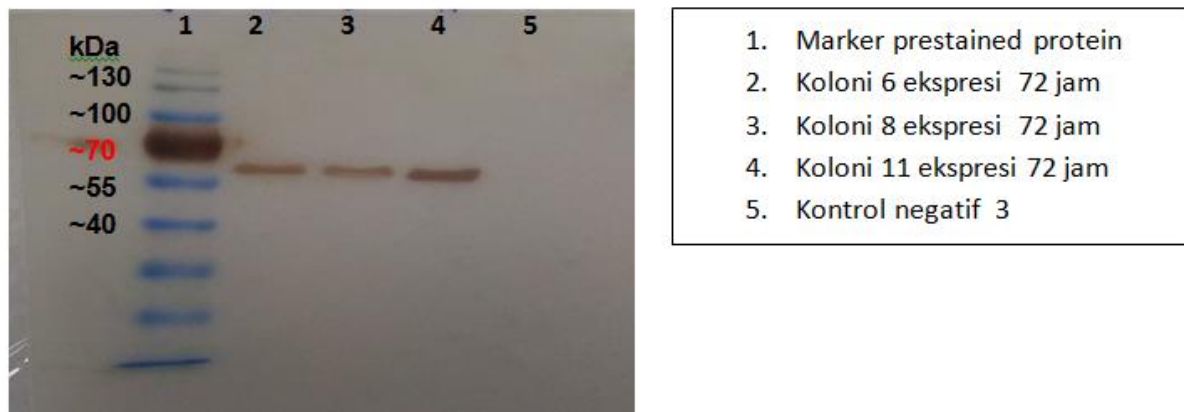
Gambar 20 Hasil Verifikasi *pichia* rekombinan dengan metode PCR primer AOX Integrant Mut⁺ yang terintegrasi di lokus AOX1 mnghasilkan 2 pita yaitu pita sesuai gen insert prM/E (2,6 kb) dan pita sesuai dengan gen AOX1 (2,2 kb).

Koloni terpilih kemudian diekspresikan dalam medium ekspresi. Protein rekombinan prM/E DENV-1 dikultur menggunakan flask dengan media 100 ml BMMY. Induksi dilakukan setiap 24 jam dengan methanol 3.0 % dengan 2 kali pemberian, pagi 1 % dan sore 2 % untuk mempertahankan induksi. Pada hari ke-4 (72 jam) kultur ekspresi protein rekombinan dipanen. Untuk ekspresi tersekresi (ekstraseluler), supernatan dipisahkan dari pelet untuk dianalisa dan disimpan pada suhu -80°C. Analisis supernatan hasil ekspresi protein rekombinan dengan metode Coomasie Stain SDS-PAGE dan Western Blot. Hasil analisa ekspresi protein rekombinan prM/E dengan elektroforesis gel poliakrilamid (SDS PAGE) dapat dilihat pada gambar 21.



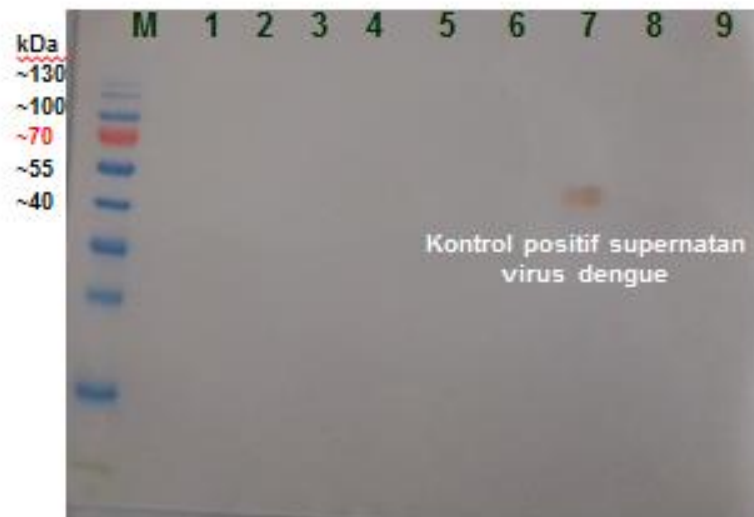
Gambar 21 Hasil SDS Page ekspresi protein rekombinan dengan modifikasi stop kodon

Klon # 6, #8 dan #11 menunjukkan pita protein berukuran sekitar 56 kDa, sesuai dengan ukuran protein rekombinan prM/E DENV-1. Protein rekombinan tersebut kemudian diuji antigenisitasnya dengan metode Western Blot. Alat yang digunakan untuk transfer protein dari gel SDS ke kertas membran adalah Trans-Blot Turbo Transfer System Biorad. Membran yang digunakan untuk transfer adalah *Trans Blot TurboTM PVDF starter kit Midi 0.2 μ M cat. #170-4156*. Hasil western blot dengan antibodi premembran dengue (genetex) dengan perbandingan 1:1000 dapat dilihat pada gambar 22. Hasil uji antigenisitas menunjukkan bahwa protein rekombinan prM/E DENV-1 dapat mengenali antibody premembran dengue sehingga dapat bersifat sebagai antigen.



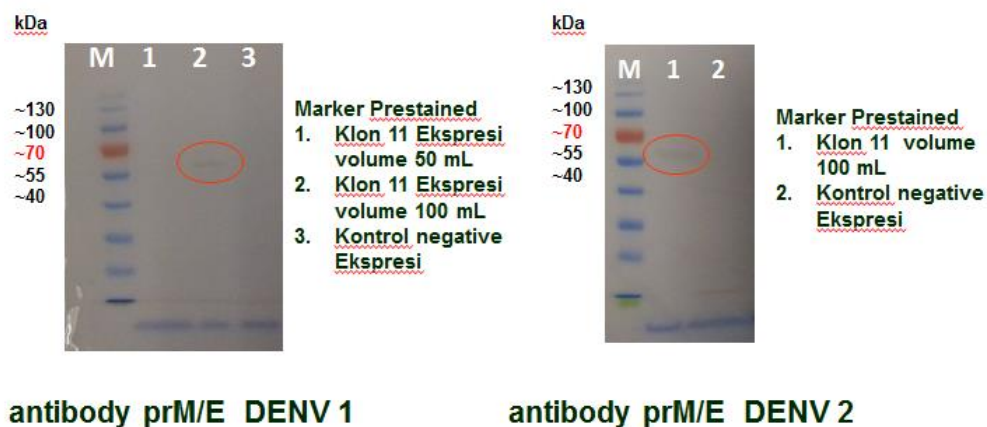
Gambar 22 Hasil western blot protein rekombinan prM/E DENV-1

Selain itu analisa western blot dilakukan menggunakan antibody lain, yakni monoclonal antibody anti Envelope 4G2-HRP (1:1000). Namun hasilnya negative, kemungkinan epitope antibody monoclonal terbatas sehingga tidak dapat mengenali antigen prM/E DENV-1. Hasil tersebut dapat dilihat pada gambar 23.

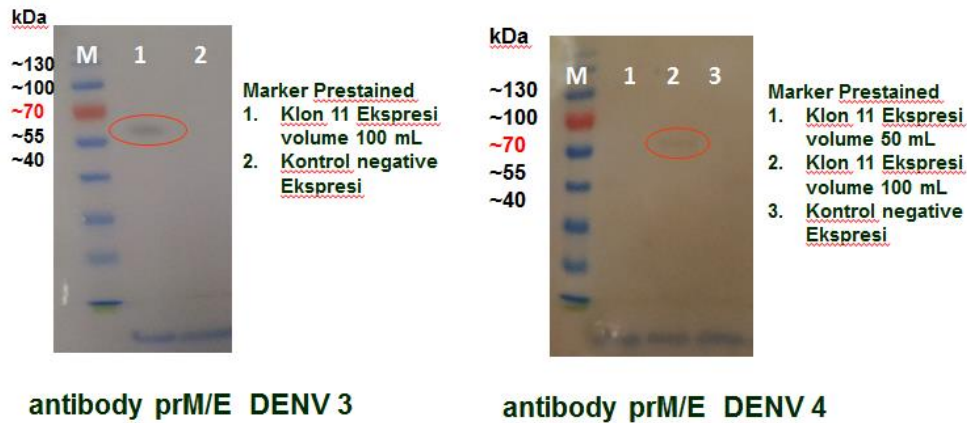


Gambar 23 Verifikasi *western blot* protein rekombinan prM/E supernatan dan pellet dengue virus 1 dan 4 dengan antibody anti Envelope 4G2-HRP (1:1000)

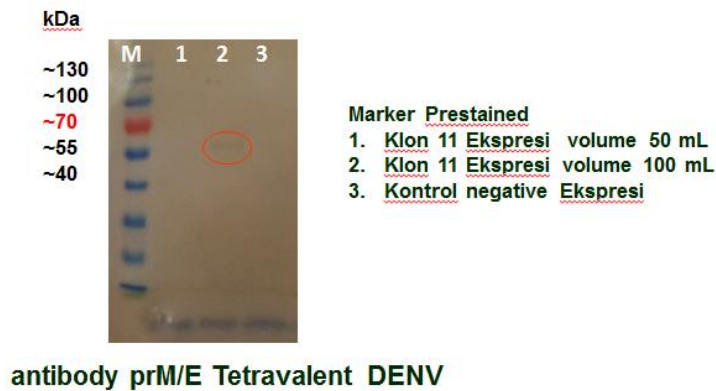
Selain dengan antibody di atas, dilakukan pula analisa Western Blot dengan antibody polyclonal antibody prM/E Dengue Virus 1, 2, 3, 4, dan tetravalent. Hasil uji antigenisitas bahwa protein prM/E DENV-1 dapat mengenali antibody prM/E DENV-1,-2,-3,-4 dan tetravalent. Hasil tersebut dapat dilihat pada gambar 24-26.



Gambar 24 Hasil analisa Western Blot protein rekombinan prM/E supernatan klon 11 dengan poliklonal antibody prM/E DENV 1 dan 2 (UI, 1: 10.000)



Gambar 25 Hasil analisa Western Blot protein rekombinan prM/E supernatan klon 11 dengan poliklonal antibody prM/E DENV 3 dan 4 (UI, 1: 10.000)



Gambar 26 Hasil analisa Western Blot protein rekombinan prM/E supernatan klon 11 dengan poliklonal antibody prM/E DENV Tetravalent (UI, 1: 10.000)

Analisa *P. pastoris* rekombinan pPICZαA prM/E DENV-1 klon 11 juga dilakukan dengan metode sekuensing. Hasil sekuensing dapat dilihat pada gambar 27.



Gambar 27 Hasil Verifikasi *P. pastoris* rekombinan pPICZαA prM/E DENV-1 klon 11 dengan sekuensing.

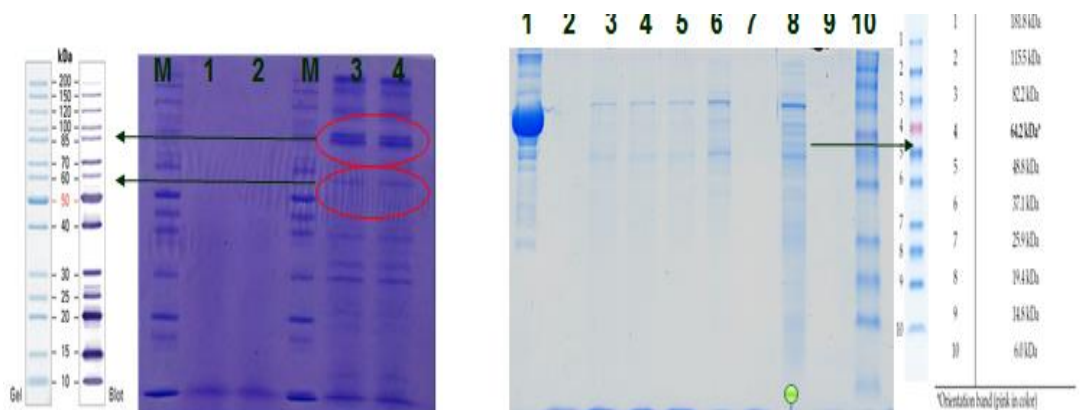
Sekuensing lengkap gen insert (~2 kb) menggunakan primer AOX1 & 2 pasang primer prM/E DENV-1 menunjukkan hasil yakni gen insert di *P. pastoris* ada perubahan basa ke 2240-2241 dengan start 1 dari start codon (ATG). Perubahan yakni basa GA menjadi AG. Namun perubahan basa tersebut tidak merubah asam amino (silent mutation).

KETERBATASAN PENELITIAN

Selanjutnya metode ekspresi yang telah optimal tersebut ketika dilanjutkan kembali untuk produksi protein rekombinan skala besar mengalami hambatan. Kemungkinan penyebab hambatan adalah proses ekspresi protein rekombinan dikerjakan menggunakan flask tanpa buffled sehingga banyak parameter yang tidak bisa dikontrol seperti kadar methanol dan glukosa. Sehingga diupayakan akan dilanjutkan proses ekspresi proteinnya di industry Bio Farma menggunakan bioreactor dan sebagai alternative untuk skala lab penelitian mencoba dengan melakukan transformasi ke *P. pastoris* strain lain yaitu strain X33.

Kendala- kendala yang ditemukan saat proses ekspresi protein rekombinan dalam skala besar dan lanjutan sebagai berikut:

1. Hasil SDS Page 10% supernatan ekspresi skala 400 mL (11-D1 induksi 3%, 16E-D4 induksi 2%) hasil yang diperoleh adalah pita tipis di 56 kDa, dan pita yang lain terlihat tebal di 85 kDa (16E-D4), untuk 11-D1 ada pita sangat tipis namun kemudian setelah diulang dengan volume 250 mL dan 100 ml seperti hasil positif sebelumnya hasil SDS sama namun sangat tipis, tidak bisa didokumentasikan. Hasil dapat dilihat pada gambar berikut.



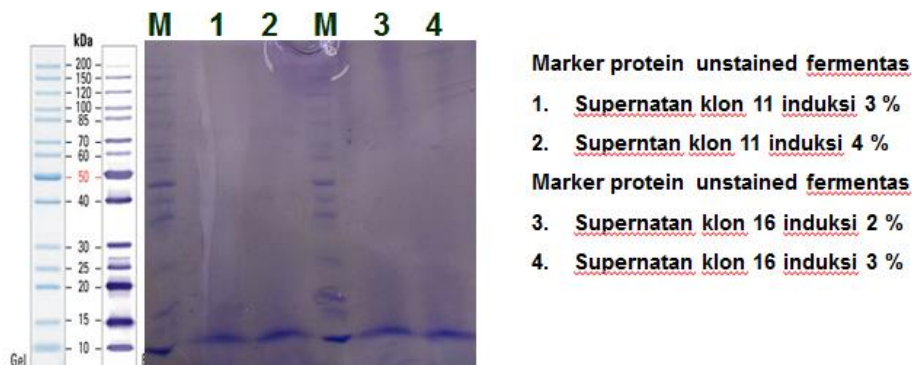
Marker Protein Unstained

1. Supernatan klon 11 (kultur 400 mL)
2. Supernatan klon 11 (kultur 400 mL)
3. Supernatan klon 16E (kultur 400 mL)
4. Supernatan klon 16E (kultur 400 mL)

1. BSA control
2. -
3. Sebelum Sentrifuge
4. Setelah Sentrifuge
5. Filtrat 0,22
6. Konsentrat
7. Permeate
8. Retentate Buffer Exchange
9. Supernatan Buffer Exchange
10. Supernatan Buffer Exchange

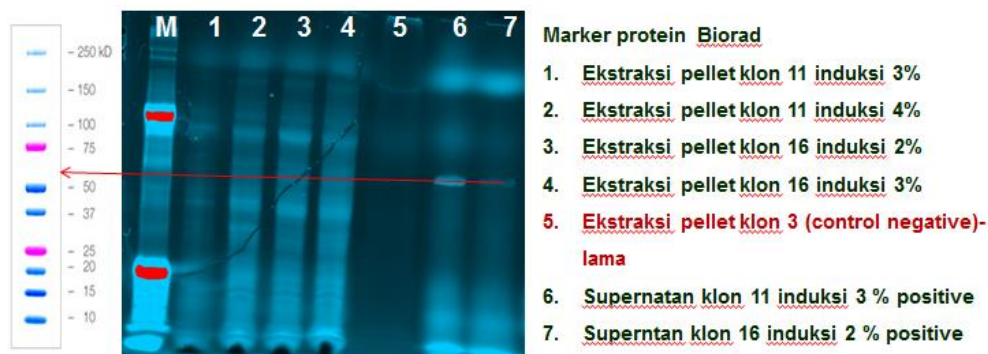
Gambar 28 hasil SDS Page 10% scale up ekspresi protein

2. Optimasi dilanjutkan dengan mengubah konsentrasi Methanol induksi dari 3% (klon 11-D1) menjadi konsentrasi 1%, 2% dan 4%. Dan Klon 16-D4 dari 2% menjadi konsentrasi 1%, 3% dan 4%. Selain itu, dilakukan perubahan sentrifuge pemisahan supernatan dan pellet, yang sebelumnya selama 1 jam menjadi 15 menit. Hasil SDS supernatan menunjukkan hasil tidak ada pita (negative). Hasil dapat dilihat pada gambar berikut.



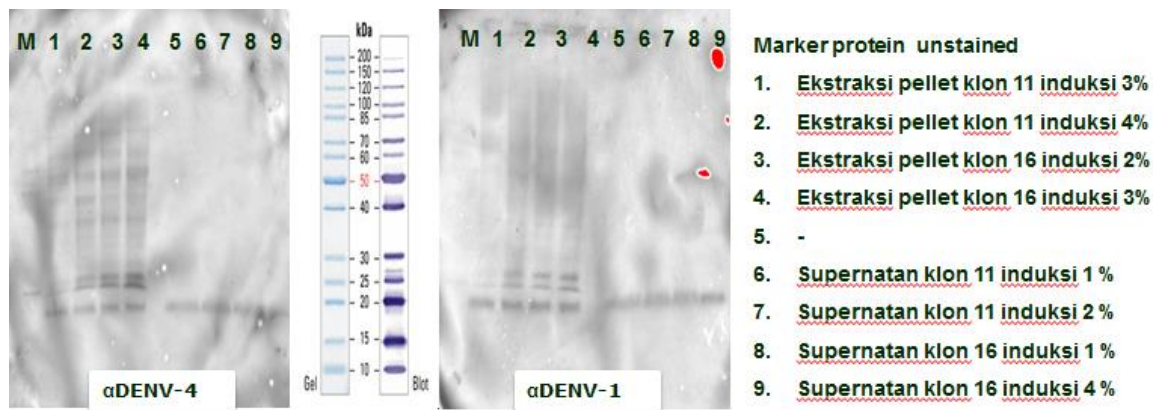
Gambar 29 Hasil SDS 10% optimasi ekspresi dengan perubahan konsentrasi Methanol induksi

3. Dilakukan ekstraksi protein intraseluler. Hasil analisa SDS 10% dengan gel stain free menunjukkan positive dengan ukuran ~56 kDa.



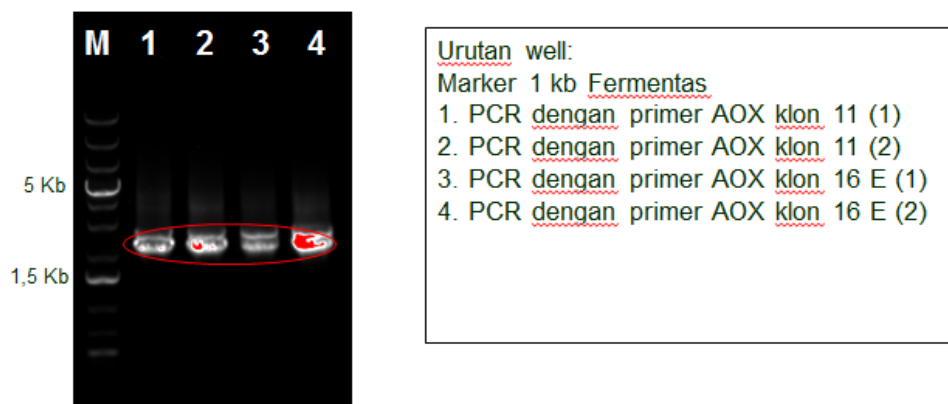
Gambar 30 Hasil analisa SDS 10% dengan gel stain free

4. Ekspresi protein intraseluler (sel pellet) hasil kemudian dianalisa dengan menggunakan metode SDS 10%. Hasil menunjukkan positive dengan ukuran ~55 kDa. Verifikasi dengan western blot dengan antibody prM/E DENV 1 dan 4 (UI, 1:10.000). Hasil menunjukkan band tidak spesifik di pellet dan di supernatant menunjukkan hasil negative.



Gambar 31 Western blot protein intraselular dengan antibody prM/E DENV 1 dan 4 (UI, 1:10.000)

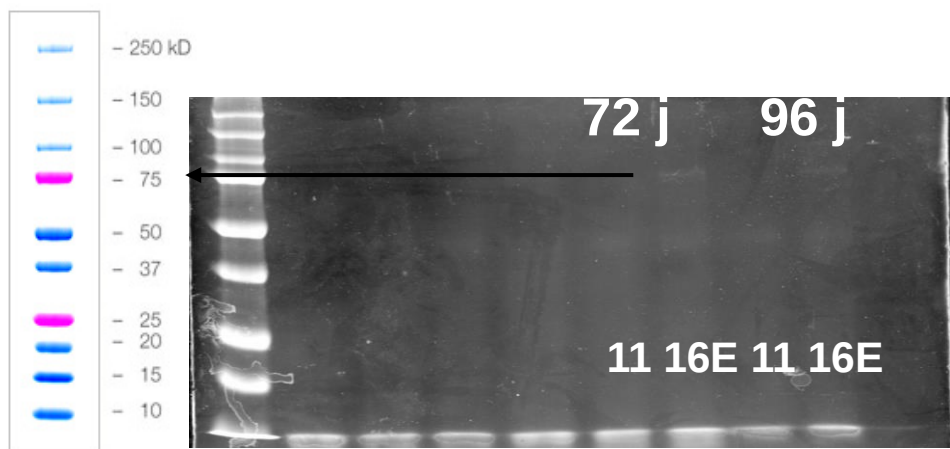
5. Ekstraksi DNA genom dari kultur ekspresi BMMY. Kemudian DNA diverifikasi dengan menggunakan PCR dengan primer AOX 1. Hasil menunjukkan positive DNA insert prM/E masih terintegrasi dalam pichia. Integrant Mut+ (terintegrasi di lokus AOX1): 2 pita yaitu: pita sesuai gen insert prM/E (2,6 kb) dan pita sesuai dengan gen AOX1 (2,2 kb). Hasil dapat dilihat pada gambar berikut.



Gambar 32 Hasil PCR AOX koloni terpilih dari kultur medium ekspresi

Untuk mengatasi kendala-kendala di atas, maka dilakukan optimasi ekspresi protein rekombinan prM/E Dengue 1. Dilakukan ekspresi sesuai literatur yakni Cardoso, 2013. Optimasi yang dilakukan sebagai berikut. Kultur di medium YPD Broth 2,5 mL selama 24 jam. Rekultur sebanyak 2,5 mL kultur YPD Broth ke dalam 500 mL medium BMMY. Inkubasi shaker 28 °C, 250 rpm selama 3 hari. Rekultur sebanyak x mL ke medium BMMY 100 mL dengan OD600 = 20 (pellet di cuci dengan peptone steril, sentrifuge 1500 g selama 5 menit. Pellet diresuspen medium BMMY). Dikultur selama 96 jam dengan induksi methanol 3%, pemberian 2 kali dosis, 1% pagi dan 2 % sore. Sampling setiap 24 jam, pisahkan pellet

dan supernatan. Hasil supernatan di SDS page 10%. Hasil SDS dapat dilihat pada gambar berikut.

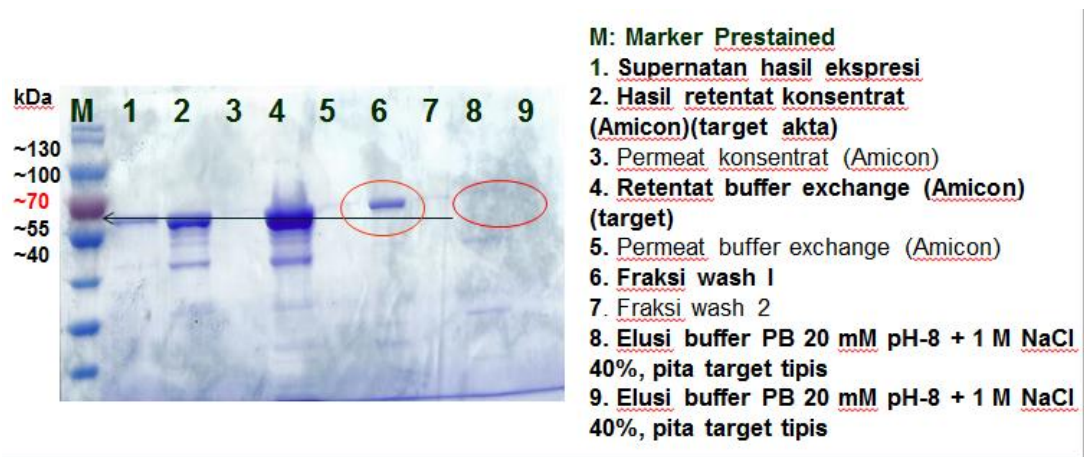


Gambar 33 Hasil SDS Page supernatant ekspresi dengan metode Cardoso

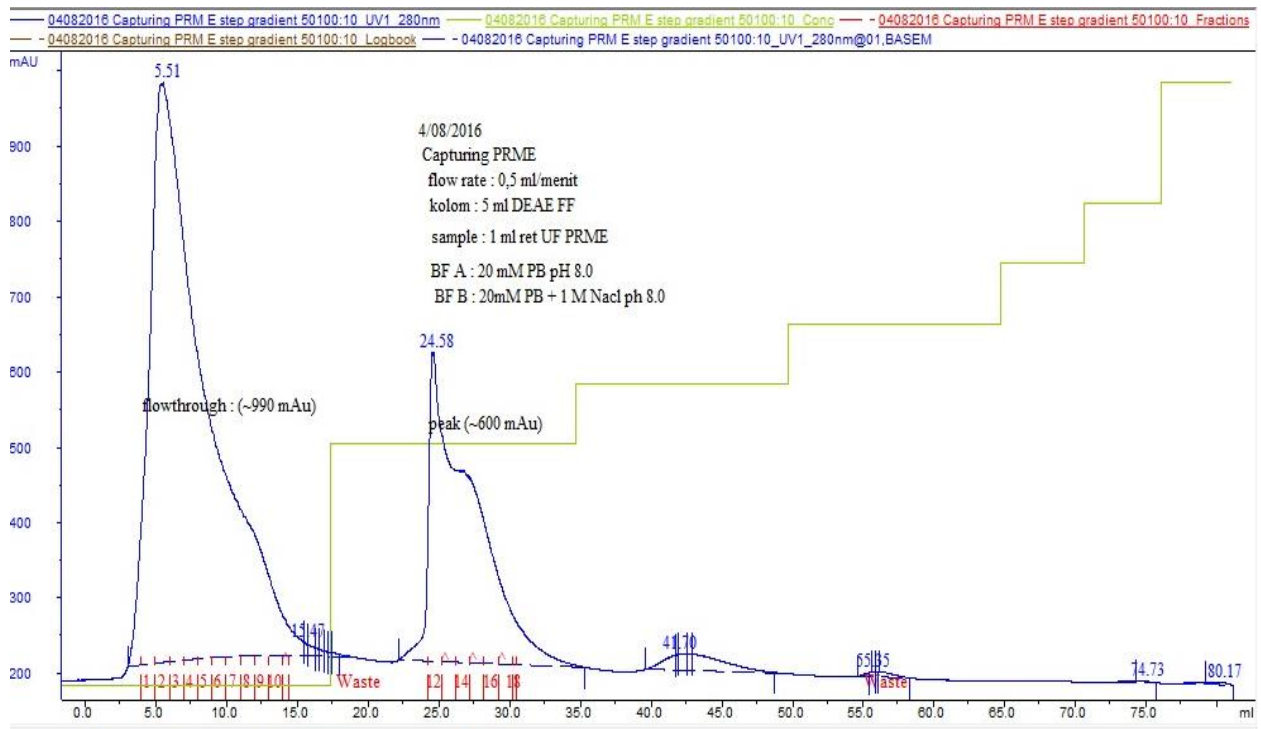
Optimasi Purifikasi Protein

Hasil optimasi awal purifikasi protein rekombinan prM/E dengue serotipe 1 sebagai berikut:

- a. Optimasi pertama kolom yang digunakan adalah weak anion (DEAE FF), dengan menggunakan buffer phosphate 20 mM + 1M NaCl 40%, pH 8, alat purifikasi nya adalah : Akta Purifier. Hasil yang diperoleh dianalisa dengan menggunakan SDS Page 10%. Hasil yang diperoleh dapat dilihat pada gambar berikut.

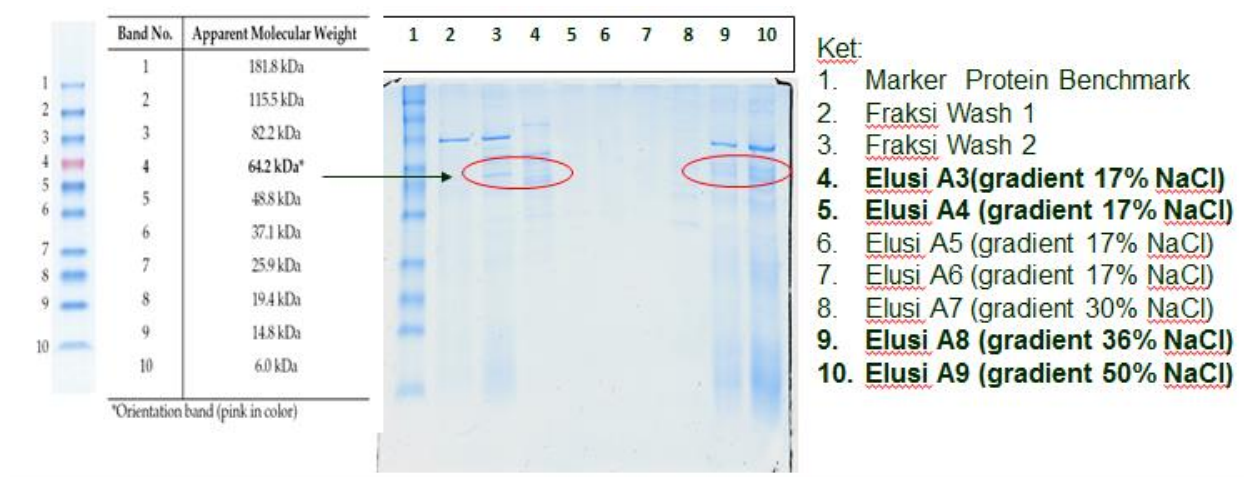


Gambar 34 Hasil SDS page optimasi pertama Purifikasi Protein Rekombinan prM/E

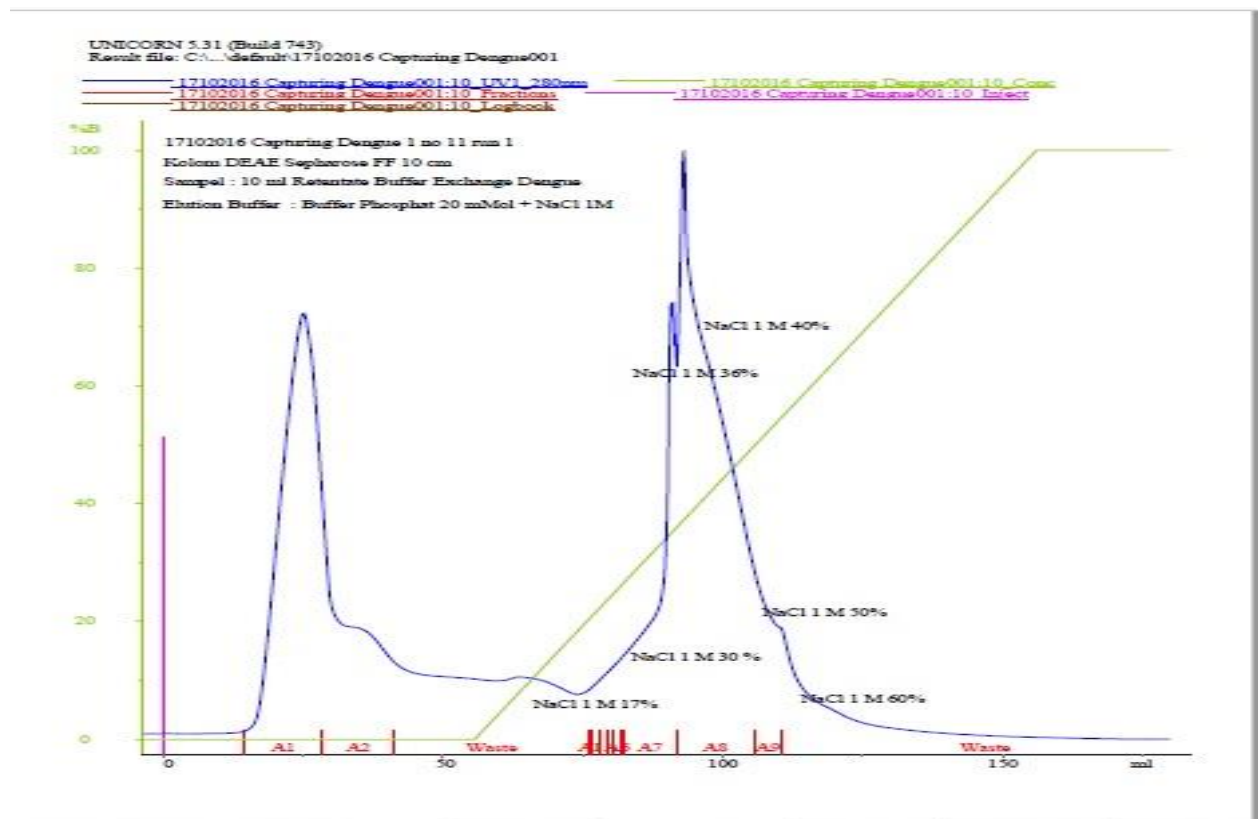


Gambar 35 Grafik optimasi purifikasi IEC 1

b. Optimasi kedua IEC, weak anion DEAE FF, phosphate buffer pH 8, gradien 0-100%.kolom yang digunakan adalah weak anion (DEAE FF). Hasil yang diperoleh dianalisa dengan menggunakan SDS Page 10%. Hasil yang diperoleh dapat dilihat pada gambar berikut.

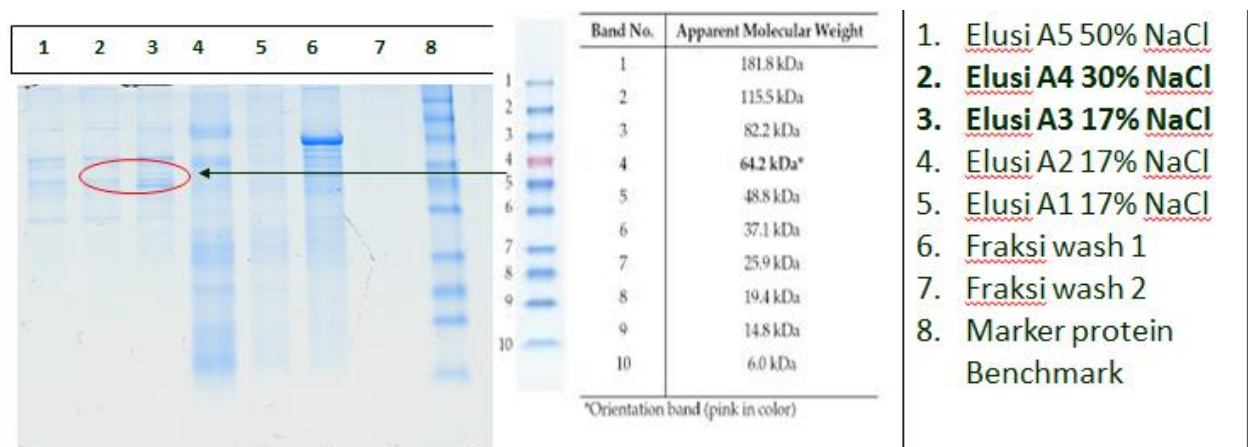


Gambar 36 Hasil SDS page optimasi kedua Purifikasi Protein Rekombinan prM/E

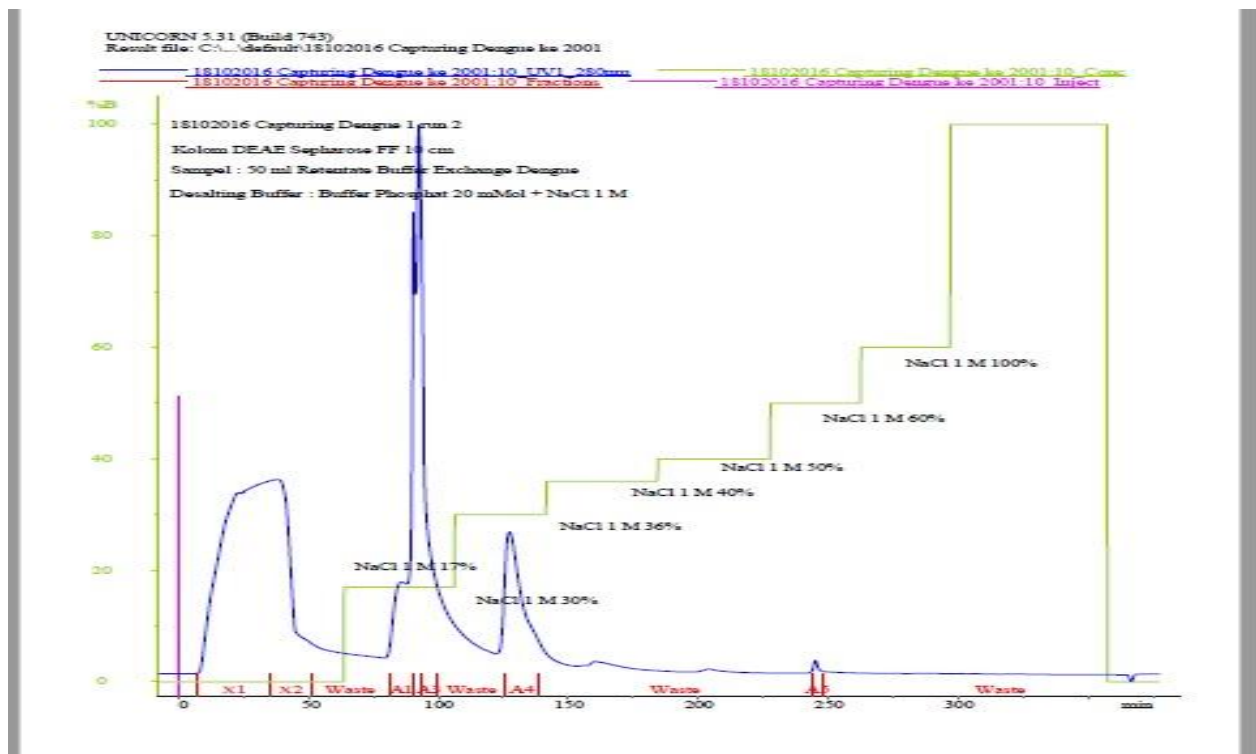


Gambar 37 Grafik optimasi purifikasi IEC 2

c. Optimasi ketiga Ion Exchange Chromatography dengan menggunakan Akta Purifier dengan Resin DEAE FF. Hasil yang diperoleh dianalisa dengan menggunakan SDS Page 10%. Hasil yang diperoleh dapat dilihat pada gambar berikut.

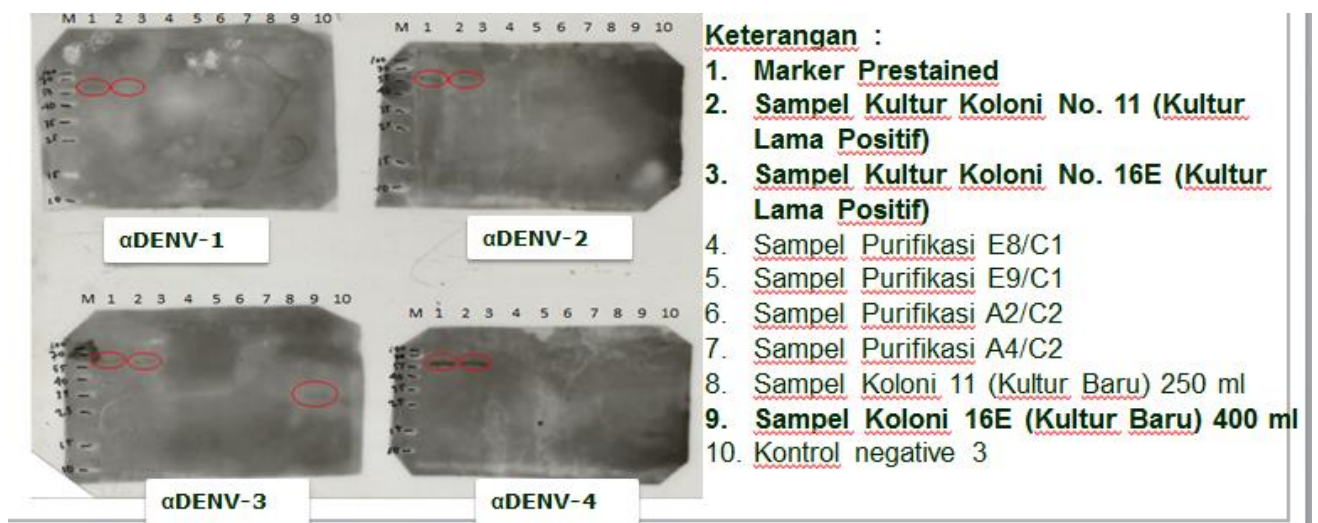


Gambar 38 Hasil SDS page optimasi ketiga Purifikasi Protein Rekombinan prM/E



Gambar 39 Grafik optimasi purifikasi IEC 3

Hasil optimasi protein rekombinan kemudian diverifikasi dengan metode western blot. Hasil optimasi Purifikasi Protein Rekombinan prM/E klon 11 (DENV-1) dan klon 16E (DENV-4) metode Ion Exchange Chromatography (di Bio Farma) selanjutnya dianalisa dengan Western Blot menggunakan antibody prM/E DENV-1,-2,-3, dan 4. Transfer protein dengan membran PVDF dan visualisasi dengan ECL di film (BPPT) perbandingan 1:10.000. Hasilnya dapat dilihat pada gambar 40.



Gambar 40. Hasil western blot protein rekombinan hasil optimasi purifikasi

5.2 PENELITIAN DI BADAN PENGKAJIAN DAN PENERAPAN TEKNOLOGI (BPPT)

1. Kloning gen prME DENV-3 dalam vektor pPICZ α -A pada *E.coli*

Secara umum tahapan kloning gen prME DENV-3 dalam vektor pPICZ α -A terdiri atas 3 tahap, yaitu persiapan insert gen prM/E melalui tahapan PCR, transformasi gen prM/E ke dalam bakteri *E.coli* TOP10F' melalui metode *heat shock*, dan verifikasi keberadaan gen insert dalam plasmid rekombinan melalui metode digesti dan sekuensing. Berikut adalah ketiga tahapan yang telah dilakukan dalam penelitian:

a. Persiapan insert gen prM/E DNA

Persiapan DNA insert gen prM/E dilakukan dengan metode PCR. Primer yang digunakan dalam mengamplifikasi gen prM/E adalah pasangan primer prM/E yang didesain oleh LITBANGKES. Pasangan primer ini didesain spesifik mengamplifikasi gen pr-ME DENV3 strain 141. Kedua pasangan primer didesain dengan menambahkan situs restriksi enzim *PmlI* dan *XbaI* yang terletak pada ujung dari masing-masing primer tersebut. Berikut adalah sekuens primer yang digunakan untuk mengamplifikasi gen Pr-ME DEN3 141:

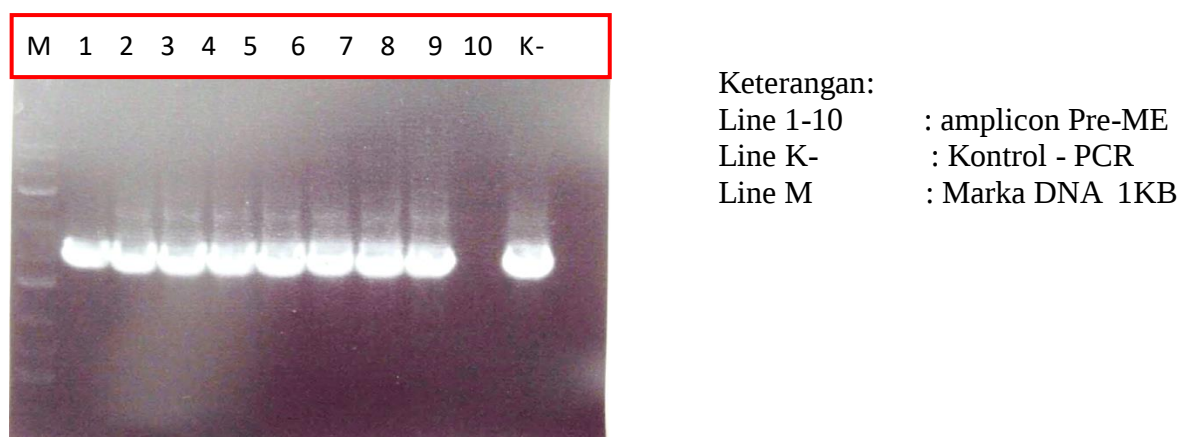
1. Primer forward D3-141prM/EpPICZaAPml1F:

TAAT **CAC↓GTG**AAAAGATTCCACTTAAC TTCACGAGATGGAGAG

2. D3-141prM/EpPICZaAXba1R:

TAAT **T↓CTAG**ACTAAGCTTGACACCGGCTCCCAGATA

Dan berikut adalah ampikon hasil amplifikasi gen pr-ME yang divisualisasi di gel agarose 1%.



Gambar 41 Visualisasi hasil PCR gen prM/E DENV-3 pada gel agarose 1%

b. Transformasi gen pr-ME ke dalam bakteri *E.coli* TOP10F' melalui metode *heat shock*

Sebelum dilakukan transformasi gen, proses pembuatan sel *E.coli* kompeten dan ligasi antara gen prME dan vector pPICZ α -A dilakukan terlebih dahulu. Pembuatan sel *E.coli* kompeten dilakukan dengan metode kimia CaCl₂, dan proses ligase dilakukan dengan enzim T4 DNA Ligase. Berikut merupakan resep ligasi yang digunakan dalam penelitian:

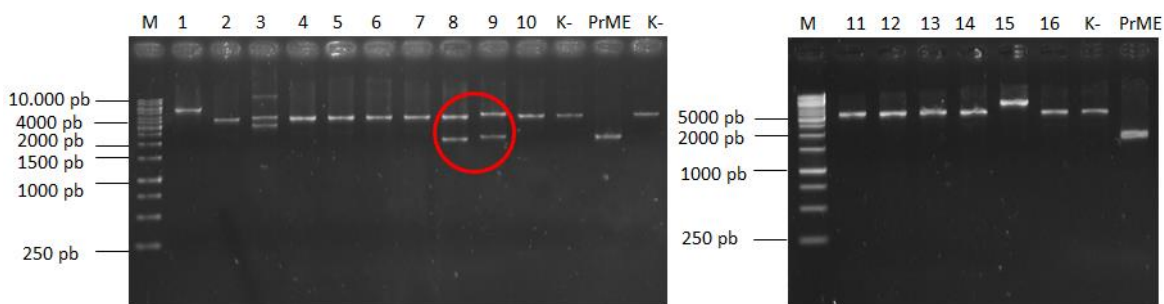
LIGASI (1:10)

- Vektor : 25 μ l (50 ng)
- DNA pre-ME : 17 μ l (500 ng)
- Enzim T4 DNA Ligase : 3 μ l
- 10 x Buffer ligase : 5 μ l
- Jumlah : 50 μ l

Proses inkubasi dalam 22°C selama 1 jam, dan dilanjutkan dengan inaktivasi pada suhu 65°C selama 10 menit. Transformasi hasil ligase gen pr-ME ke dalam sel *E.coli* 10 menggunakan metode heat shock. Berdasarkan transformasi, didapat 16 koloni *E.coli* rekombinan yang hidup pada media seleksi LB low Salt + 25 μ g/ml Zeocin.

c. Verifikasi keberadaan gen insert dalam plasmid rekombinan melalui metode digesti dan sekuensing

Verifikasi pertama yang dilakukan untuk mengecek keberadaan insert gen prM/E DENV-3 dalam plasmid rekombinan adalah dengan memotong plasmid tersebut dengan enzim restriksi *Pml*I dan *Xba*I. Berdasarkan hasil pemotongan kedua enzim, didapat 2 koloni yaitu no. 8 dan 9 yang diketahui membawa insersi gen Pr-ME (Gambar 2). Hal ini ditandai dengan adanya 2 pita DNA, yaitu pita DNA gen Pr-ME sebesar 2.000 pb, dan satu pita lain yaitu sebesar 3.500 pb untuk vector pPICZ α -A



Keterangan :

M : Marker 1 KB DNA Ladder

1-16 : DNA plasmid sample yang didigesti oleh enzim *Xba*I dan *Eco*72I

K- : kontrol negatif (plasmid pPICZ α -A)

Gambar 42 Hasil verifikasi keberadaan insersi gen prM/E DENV-3 pada 16 plasmid yang dilakukan dengan metode digesti

Verifikasi kedua dilakukan dengan men-sequensing plasmid rekombinan koloni no. 8 dan 9 dengan Primer AOX1. Berdasarkan hasil analisis sekuensing plasmid rekombinan no 8 menggunakan primer AOX forward, didapatkan sequence nukleotida sebesar 1-733 yang relative homolog terhadap sampel prME 141 DENV3. Hal ini karena adanya mutasi dari A ke T pada nukleotida ke 18, yang diketahui tidak mengubah sekuens asam amino. Sedangkan analisis sekuensing dengan primer AOX1 reverse menghasilkan sekuens sepanjang 846 pb (posisi ke 1145-1977) yang homolog 100% dengan sampel prME 141 DENV3. Pada tahapan selanjutnya, diperlukan sekuensing dengan primer internal gen Pr-M/E yang bertujuan untuk mengetahui kebenaran open reading frame gen pr-ME pada plasmid rekombinan.

```

File Name      : Sampel_1__asri__F1 cut 700 bp.txt
Sequence Size  : 815

2nd Nucleotide Sequence
File Name      : DENV3-141-Litbangkes-prM-E.txt
Sequence Size  : 1977

Unit Size to Compare = 6
Pick up Location   = 1

[99.8% / 529 bp]      INT/OPT.Score : < 2110/ 2110 >

241' TATCTCTCGAGAAAAGAGAGGCTGAAGCTGAATTCACGTGAAAAGATTCCACTTAACTTC
*****
1"                                     TTCCACTTAACTTC

301' ACGTGATGGAGAGCCGCGCATGATTGTGGGAAGAATGAAAGAGGAAAATCCCTACTTTT
*** *****
15" ACGAGATGGAGAGCCGCGCATGATTGTGGGAAGAATGAAAGAGGAAAATCCCTACTTTT

361' CAAGACAGCCTCTGGAATCAACATGTGCACACTCATAGCTATGGATCTGGGAGAGATGTG
*****
75" CAAGACAGCCTCTGGAATCAACATGTGCACACTCATAGCTATGGATCTGGGAGAGATGTG

421' TGATGACACGGTCACTTACAAATGCCCCACATTACCGAAGTGGAGCCTGAAGACATTGA
*****
135" TGATGACACGGTCACTTACAAATGCCCCACATTACCGAAGTGGAGCCTGAAGACATTGA

481' CTGCTGGTGCAACCTTACATCGACATGGGTGACTTATGGAACATGCAATCAAGCTGGAGA
*****
195" CTGCTGGTGCAACCTTACATCGACATGGGTGACTTATGGAACATGCAATCAAGCTGGAGA

541' GCATAGACGCGATAAGAGATCAGTGGCGATAGCTCCCATGTTGGCATGGGACTGGACAC
*****
255" GCATAGACGCGATAAGAGATCAGTGGCGATAGCTCCCATGTTGGCATGGGACTGGACAC

601' ACGCACTCAAACCTGGATGTCTGGCTGAAGGAGCTTGGAGACAAGTCGAGAAGGTAGAGAC
*****
315" ACGCACTCAAACCTGGATGTCTGGCTGAAGGAGCTTGGAGACAAGTCGAGAAGGTAGAGAC

```

Gambar 43 Hasil analisa sekuensing menggunakan primer AOX forward.

```

          10      20      30      40      50
Sampel_1__asri__F1 cut 700 bp  FHLTSRDGEPRMIVGKNERGKSLLEKTASGINMCTLIAMDLEGEMCDDTVT
DENV3-141-Litbangkes-prM-E  .....

          60      70      80      90     100
Sampel_1__asri__F1 cut 700 bp  YKCPHITTEVEPEDIDCWNLSTSTWVTYGTGNQAGEHRRDKRSVAIAPHVG
DENV3-141-Litbangkes-prM-E  .....

          110     120     130     140     150
Sampel_1__asri__F1 cut 700 bp  MGLDTRTQTWMSAEGAWRQVEKVEWALRHPGFTILALFLAHYIGTSLTQ
DENV3-141-Litbangkes-prM-E  .....

          160     170     180     190     200
Sampel_1__asri__F1 cut 700 bp  KVVIFILMLLVTFSMTMRCVGVGNRDX-----
DENV3-141-Litbangkes-prM-E  .....FVEGLSGATWVDVVLEHGGCVTTM

```

Gambar 44 Hasil translasi nukleotida hasil sekuensing dengan primer forward AOX ke sekuens asam amino

```

1st Nucleotide Sequence
File Name       : Sampel_1__asri__R1 cut 700.txt
Sequence Size   : 846

2nd Nucleotide Sequence
File Name       : DENV3-141-Litbangkes-prM-E.txt (Complementary)
Sequence Size   : 1977

Unit Size to Compare = 6
Pick up Location    = 1

[100.0% / 750 bp]   INT/OPT.Score : < 3000/ 3000 >

61' AGATCCTCTTCTGAGATGAGTTTTTGTCTAGACTAAGCTTGCACCACGGCTCCCAGATA
*****
1" AGCTTGCACCACGGCTCCCAGATA

121' GAGTGTAATGATTCTATCGCGATGCATGAAAATGACATAGAAGTATTTTTTGTGTTCAA
*****
25" GAGTGTAATGATTCTATCGCGATGCATGAAAATGACATAGAAGTATTTTTTGTGTTCAA

181' CCCTATCCAGGTTAAGAGGACACCTATTCCAATTTTCATCATCCAGGAGACTCCACCAA
*****
85" CCCTATCCAGGTTAAGAGGACACCTATTCCAATTTTCATCATCCAGGAGACTCCACCAA

241' TAGGGCTGTGTAAGCACTCCCAAATATTTGGTGGACCATTTTCCTAATGAATTCAAAAC
*****
145" TAGGGCTGTGTAAGCACTCCCAAATATTTGGTGGACCATTTTCCTAATGAATTCAAAAC

301' ACCACCCACTGATCCAAAGTCCCAGGCTGTGTCTCCCAAGATGGCCATGCGCCTTGACCC
*****
205" ACCACCCACTGATCCAAAGTCCCAGGCTGTGTCTCCCAAGATGGCCATGCGCCTTGACCC

361' TCTGGCAGTGGCCTCGAACATCTTCCCAATCGAGCTTCCCTTCTTGTACCAGTTGATTTT
*****
265" TCTGGCAGTGGCCTCGAACATCTTCCCAATCGAGCTTCCCTTCTTGTACCAGTTGATTTT

421' CAGGGCTTTGTCTCCAATCCAATTACTATGTTACTTTCTCCAAAAGGAGGTTGAGCCTC
*****

```

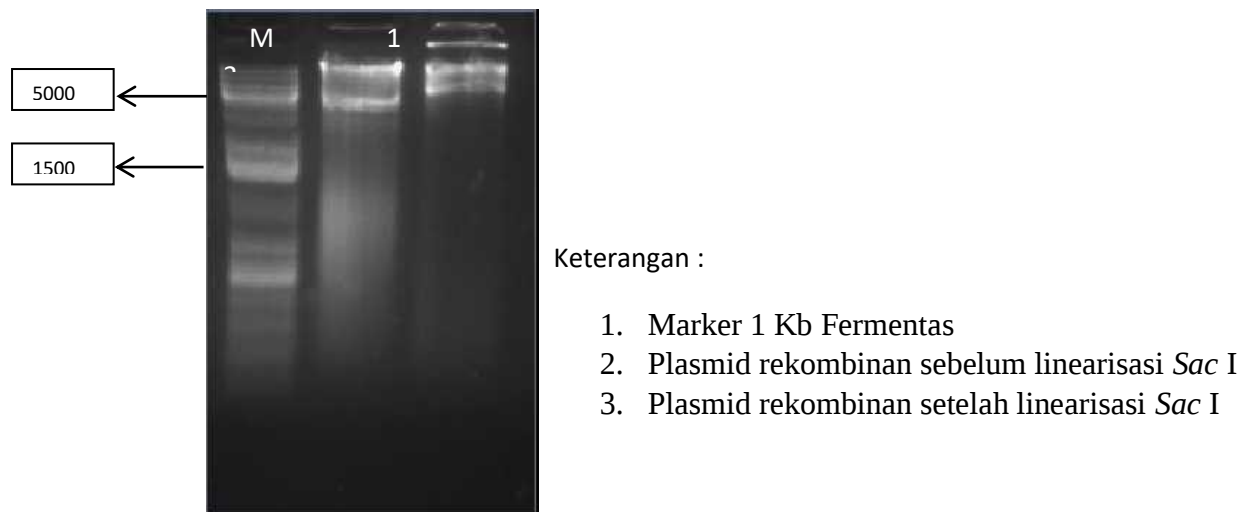
Gambar 45 Hasil analisa sekuensing menggunakan primer AOX reverse

2. Subtransformasi plasmid pPICZ α -A +prME ke dalam genom *Pichia pastoris*

Substransformasi plasmid rekombinan pPICZ α -A +prME dilakukan oleh tim peneliti LITBANGKES. Hal ini dilakukan karena setelah sejumlah subtransformasi dilakukan, tim BPPT belum berhasil melakukannya. Berikut merupakan beberapa tahapan dalam Substransformasi plasmid rekombinan pPICZ α -A +prME ke dalam genom *P. pastoris*:

a. Linierisasi plasmid rekombinan pPICZ α A/prM/E Dengue-3 dengan Enzyme SacI

Plasmid rekombinan yang sudah dikonfirmasi keberadaan dan kebenaran orientasi insert untuk plasmid rekombinan pPICZ α A/prM/E Dengue 3, kemudian dilinearisasi dengan enzim *SacI* untuk efisiensi proses transformasi. Pita yang diperoleh dari hasil linierisasi yakni untuk plasmid rekombinan ukurannya $\pm$ 5100 bp, dan kontrol negatif yang tidak mengandung insert prM/E adalah pada ukuran 3,6 kb. Campuran untuk reaksi linierisasi yang digunakan adalah 10x buffer 10 μ l, DNA plasmid rekombinan sebanyak 50 μ l, deionise water sampai volume 100 μ l. Konsentrasi DNA yang dipakai adalah 5.4 μ g/ μ l untuk plasmid rekombinan. Campuran reaksi kemudian diinkubasi pada suhu 55° C selama 4 menit untuk memaksimalkan proses linierisasi, ditambahkan enzim *SacI* sebanyak 23.5 μ l (235 unit, 25 unit/1 μ g DNA) kemudian diinkubasi pada suhu 37° C selama 4 jam, dan dinaktivasi pada suhu 65° C selama 20 menit. Hasil linearisasi dianalisis dengan gel agarose 1% dan divisualisasi dengan Etidium Bromide.. Hasil linierisasi dapat dilihat pada gambar berikut ini.



Gambar 46 Hasil linearisasi plasmid rekombinan dengan enzim *SacI*

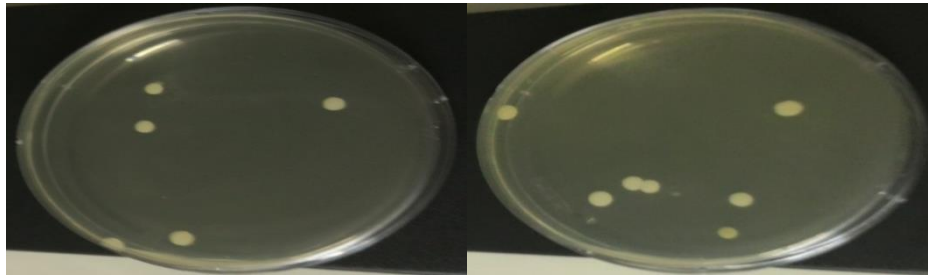
b. Penyiapan sel *Pichia pastoris* kompeten

Inokulasi strain *Pichia pastoris* pada media agar YPD (Yeast Extract Peptone Dextrose Medium) dengan campuran 1% yeast extract (oxoid, 416451), 2% peptone (Himedia, cat. 91249-500 g lot no. BCBP8880), 2% dextrose (RM016-500 G lot no. 0000043079), 2% agar

(214010, lot no. 5146181). Strain *Pichia pastoris* yang digunakan yaitu GS115. Kemudian diinkubasi pada suhu 28 °C selama 2 hari. Strain GS115 merupakan strain *Pichia pastoris* yang akan digunakan untuk proses ekspresi protein rekombinan. Koloni yang tumbuh single koloni kemudian ditumbuhkan pada 5 ml media YPD cair dengan inkubasi 28 °C *overnight* dengan shaker 250 rpm. Kemudian inokulasi kembali 0,1-0,5 ml kultur *overnight* ke 50 ml media YPD baru, dan diinkubasi kembali *overnight* pada 28 °C di shaker 250 rpm sampai OD₆₀₀ = 1,3-1,5. Kemudian sentrifugasi sel pada 1500 x g selama 5 menit di 4 °C. Kemudian diresuspensi dengan 25 ml aquabidest steril dingin. Sentrifugasi sel pada 1500 x g selama 5 menit di 4 °C, kemudian ditambahkan 25 ml aquabidest steril dingin. Sentrifugasi sel pada 1500 x g selama 5 menit di 4 °C, kemudian ditambahkan 2 ml 1M sorbitol dingin. Sentrifugasi sel pada 1500 x g selama 5 menit di 4 °C, tambahkan 100 µl 1M sorbitol dingin sampai volume akhir 150 µl. Simpan sel pada es dan gunakan pada hari yang sama. Jangan menyimpan sel.

c. Transformasi plasmid rekombinan strain *Pichia pastoris* GS115

Plasmid rekombinan ditransformasi ke sel kompeten *Pichia pastoris* GS115 menggunakan metode electroporator (Bio-Rad Gene Pulser). Protocol yang digunakan untuk *Pichia pastoris*. Sel dan sampel, kemudian disiapkan microcentrifuge tube 1.5 ml larutan sorbitol 1 M dan kuvet elektroforator 0.2 cm yang disimpan pada es. Dicampurkan 40 µl sel kompeten GS115 dan 10 µl hasil purifikasi linierisasi (konsentrasi DNA 2560 ng) pada kuvet dingin. Campuran diinkubasi pada es selama 5 menit. Pada tampilan awal alat electroporator, buka *Gen Pulser Xcell*, kemudian *Fungal Protocol screen* (tekan 4, kemudian enter 2 enter). Untuk memilih *P. pastoris*, tekan 5 dan tekan enter untuk melihat detail protokol *P. pastoris screen*. Campuran dibiarkan berada pada dasar kuvet, kemudian tempatkan kuvet pada *Shock Pod* kemudian tekan *pulse*. Pulse parameter kemudian dicatat, hasil voltase menunjukkan 1978 V dan *time constant* sebanyak 4,6 ms. Kuvet kemudian segera diambil dan segera tambahkan 1 ml 1M Sorbitol dingin. Pindahkan isi cuvet ke tabung steril 2 ml. Inkubasi pada 28 °C tanpa dishaker selama 1 jam. Kemudian *spread* 300 µl, 300 µl, 190 µl, 150 µl, 100 µl diplate YPD agar dengan zeocin 100 µg. Inkubasi pada 28 °C selama 3-10 hari sampai terbentuk koloni. Hasil inkubasi koloni yang terbentuk dapat dilihat pada gambar berikut.



Gambar 47 Hasil transformasi plasmid rekombinan prM/E Dengue 3 pada *P. pastoris* strain GS115

d. Identifikasi transformant plasmid rekombinan prM/E Dengue 3 di *Pichia pastoris*

d.1. Isolasi DNA plasmid rekombinan di *Pichia pastoris*.

Dilakukan kultur single koloni pada medium YPD (Yeast Extract Peptone Dextrose Medium) dengan campuran 1% yeast extract (oxoid, 416451), 2% peptone (Himedia, cat. 91249-500 g lot no. BCBP8880), 2% dextrose (RM016-500 G lot no. 0000043079) yang mengandung 100 µg/ml zeocin. Kemudian diinkubasi pada suhu 28 °C selama overnight dengan shaker 250 rpm. Isolasi DNA plasmid rekombinan manual di *Pichia pastoris* dengan cara sebagai berikut:

Kultur yeast overnight dipanen, dengan sentrifuge selama 5 menit pada 1200xg suhu ruang, kemudian dibuang supernatan. Pelet diresuspen dengan destilated water steril, dan disentrifuge selama 5 menit pada 1200xg suhu ruang, kemudian dibuang supernatan. Tahap selanjutnya adalah memecah cell pichia. Resuspen pelet dengan 200 uL breaking buffer (2% (v/v) Triton X-100, 1% (v/v) Sodium Dodecyl Sulfate (SDS), 1mM NaCl, 10 mM Tris.Cl, pH 8.0, 1 mM EDTA, pH 8.0), campuran dipindahkan pada tube 1.5 ml, kemudian ditambahkan dengan glass beads setara dengan volume pellet. Ditambahkan 200 uL phenol/kloroform/Isoamylalkohol (25:24:1). Campuran kemudian divortex dengan kecepatan 8 selama 3 menit. Dilakukan tepat waktu, karena vortex terlalu lama dapat merusak DNA. Tambahkan 200 µl TE buffer dan vortex sebentar. Kemudian disentrifuge selama 5 menit pada 13.000 rpm suhu ruang, supernatan dipindahkan pada tabung baru. Kemudian ditambahkan 1 ml ethanol 100%, bolak balikan tabung kemudian disentrifuge selama 5 menit pada 13.000 rpm suhu ruang, supernatan dibuang kemudian resuspen pellet dengan 400 µl TE buffer. Tahap selanjutnya adalah menghilangkan kontaminan RNA dan mendapatkan DNA. Ditambahkan 30 µl DNase free-RNaseA 1 ug/ml, campur kemudian diinkubasi pada 37 °C selama 5 menit. Kemudian ditambahkan dengan 10 uL 4 M Ammonium Asetat dan 1 ml ethanol 100 %, kemudian pipet *up and down*. Campuran kemudian disentrifuge dengan kecepatan 14000 rpm selama 3 menit pada suhu ruang. Supernatan dibuang dan pelet

dikeringkan. Resuspen DNA dengan 100 µl TE Buffer, kemudian dihitung konsentrasi DNA yang diperoleh dengan NanoView. Hasil dapat dilihat pada tabel berikut.

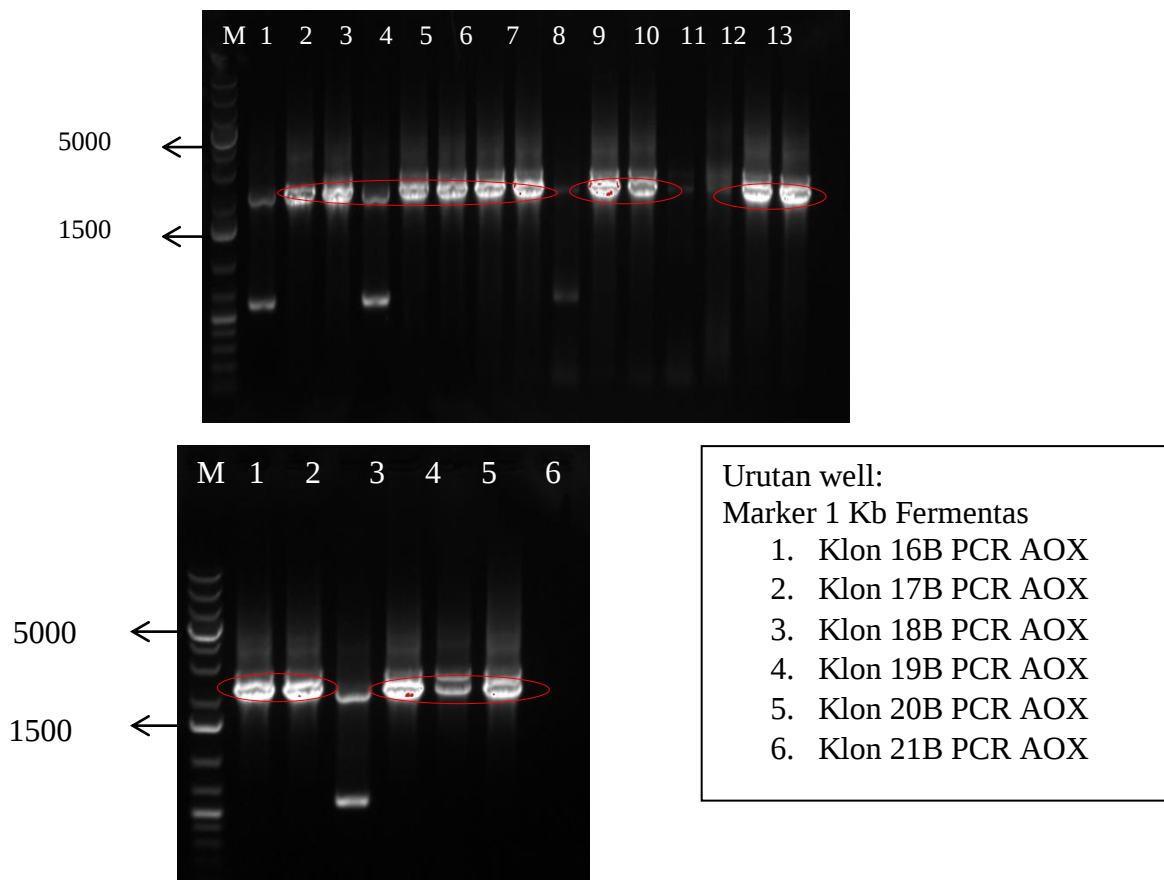
Tabel 6 Konsentrasi hasil isolasi genom pichia rekombinan prM/E Dengue 3

Sampel	[ng/µl]	A _{260/280}
Klon 1	1102	2.172
Klon 2	1832	1.625
Klon 3	4215	1.818
Klon 4	1468	1.834
Klon 5	747	1.935
Klon 6	340.5	1.821
Klon 7	1193	1.972
Klon 8	1058	1.838
Klon 9	462.5	1.907
Klon 10	1438	1.794
Klon 11	1280	1.843
Klon 12	2190	1.653
Klon 13	1336	2.158
Klon 14	1014	2.060
Klon 15	586.5	2.715
Klon 16	552.5	1.895
Klon 17	1119	2.115
Klon 18	880.5	2.668
Klon 19	833.5	1.936
Klon 20	1484	1.937
Klon 21	1640	1.921

d.2. Verifikasi transformant plasmid rekombinan di *Pichia pastoris* dengan PCR

Identifikasi transformant plasmid rekombinan di *Pichia pastoris* dilakukan dengan PCR menggunakan primer spesifik AOX1. Kit yang digunakan untuk polimerisasi adalah Platinum Taq DNA Polymerase Cat No# 10966-018 Lot No#. Prosedur kerja PCR untuk satu reaksi yang dilakukan sebagai berikut: campurkan 10x PCR Buffer (-) Mg sebanyak 5 µl, 10 mM dNTP mix sebanyak 1 µl, 50 mM MgCl₂ sebanyak 1.5 µl, 10 mM AOX F sebanyak 1 µl, 10 mM AOX R sebanyak 1 µl, template DNA (400 ng) sebanyak 1 µl dan deionized

water sebanyak 38.5 μ l. Siklus suhu yang digunakan dengan primer AOX adalah denaturasi awal 94°C selama 2 menit, denaturasi pada 94°C selama 1 menit, annealing pada 55°C selama 1 menit, ekstensi 72 °C selama 4 menit dengan pengulangan sebanyak 40 siklus. Hasil identifikasi dengan primer AOX apabila mengandung plasmid rekombinan hasilnya akan diperoleh dua pita yakni pita DNA prM/E dengan ukuran 2.600 bp dan pita gen AOX1 pada ukuran kurang lebih 2.200 bp. Hasil PCR kemudian dianalisis dengan elektroforesis gel agarose 1%. Dilanjutkan dengan visualisasi *GelDoc*. Hasil PCR dengan AOX dapat dilihat pada gambar berikut ini.



Gambar 48 Hasil visualisasi PCR genom *P. pastoris* dengan primer AOX
 Dari hasil PCR verifikasi dengan primer AOX di atas diperoleh 15 klon yang positif yaitu klon 2B, 3B, 5B, 6B, 7B, 8B, 10B, 11B, 13B, 14B, 15B, 16B, 17B, 19B, 20B, dan 21B.

3. Ekspresi protein rekombinan pr-ME pada *Pichia pastoris*

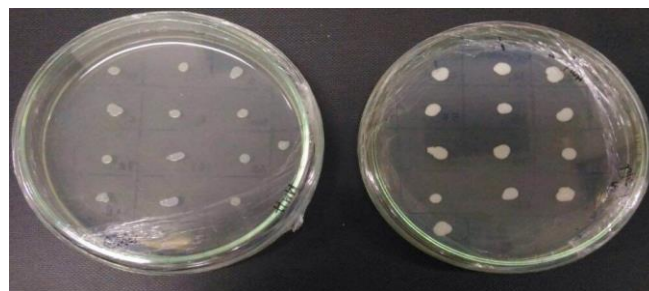
a. Uji fenotipe yeast rekombinan di media MMH dan MDH

Ekspresi protein rekombinan prME dilakukan pada 6 sampel yeast yang telah teruji positif dengan PCR. Keenam sampel tersebut yaitu, sampel no 2B, 3B, 5B, 6B, 7B, 8B, dan 21B. Namun sebelum ekspresi dilakukan, uji fenotipe pada yeast rekombinan dilakukan untuk melihat apakah ke-enam sampel tersebut memiliki fenotipe Mut⁺ atau Mut^S.

Secara alami, *P. pastoris* galur GS115 memiliki fenotipe Mut⁺, yaitu jenis yeast yang mampu memetabolisme methanol dan memanfaatkannya sebagai sumber karbon. Namun, karena adanya transformasi yeast GS115 dengan plasmid rekombinan (pPICZ α -A +prME), memungkinkan terjadinya rekombinasi homolog antara lokus 3'AOX1 pada plasmid dengan sekuens gen AOX1 pada genom ragi. Hal ini kemudian menyebabkan lokus tersebut rusak dan berakibat pada tidak tahannya yeast rekombinan untuk hidup pada media dengan methanol.

Pada uji fenotipe ini, digunakan 2 jenis media seleksi, yaitu MMH (Minimal Methanol with histidine) dan MDH (Minimal Dextrose with histidine). Yeast rekombinan yang mampu hidup pada kedua media, menunjukkan fenotipe Mut⁺ karena tahan hidup dengan methanol sebagai sumber karbon. Namun, jika hanya tumbuh pada media MDH dan tidak pada MMH, menunjukkan bahwa yeast rekombinan memiliki fenotipe Mut^S. Tujuan seleksi fenotipe ini adalah untuk menyeleksi yeast rekombinan mana yang mampu hidup pada media dengan methanol sebagai sumber karbon. Hal ini karena proses ekspresi protein rekombinan, akan digunakan methanol sebagai induktor dalam ekspresi gen.

Berdasarkan uji fenotipe yang dilakukan, diketahui bahwa ke-6 sampel merupakan yeast fenotipe Mut⁺. Hal ini ditandai dengan tumbuhnya ke-6 sampel pada media MMH dan MDH. Berikut merupakan gambar pertumbuhan ke-6 yeast rekombinan pada media MMH dan MDH.



A. MMH

B. MDH

Gambar 49 Hasil pertumbuhan ke-enam sampel pada media MMH dan MDH

b. Ekspresi protein rekombinan prM/E pada yeast *P. pastoris*

Ekspresi protein rekombinan prM/E diawali dengan menanam masing-masing 1 koloni sampel yeast pada 25 ml media cair BMGY dalam flask 250 ml. Inkubasi kultur pada incubator shaker (250 -300 rpm) dengan suhu 30°C hingga OD600 kultur mencapai 2-6. Panen sel dengan menentrifugasi kultur pada kecepatan 3000 g selama 5 menit pada suhu ruang. Buang supernatant, dan resuspensi pellet dengan media BMGY hingga mencapai OD600 awal = 1. Pindahkan resuspensi pellet tersebut ke dalam 100 ml media BMMY, dan inkubasi pada incubator shaker (250 -300 rpm) dengan suhu 30°C. Ambil 1 ml kultur

tersebut sebagai sampel jam ke 0, dan sisanya inkubasi kultur hingga jam ke 72. Masing-masing pada jam ke 24, 48, dan 72, ambil 1 ml kultur masing-masing sampel untuk analisis protein dengan sebelumnya diberikan methanol 2% sebagai induktor ekspresi.

c. Verifikasi keberadaan protein ekstraselular dan internal *P. pastoris* rekombinan

Untuk analisis protein ekstraselular, 1 ml kultur yang telah dipanen disentrifugasi pada kecepatan 5000 rpm selama 5 menit pada suhu 4°C. Ambil 100 µl supernatant kultur dan tambahkan dengan 100 µl SDS Loading dye 6x. Resuspesi kedua larutan tersebut dan rebus dalam air mendidih selama 10 menit. Sampel kemudian siap untuk dianalisis dengan SDS-PAGE dan western blot.

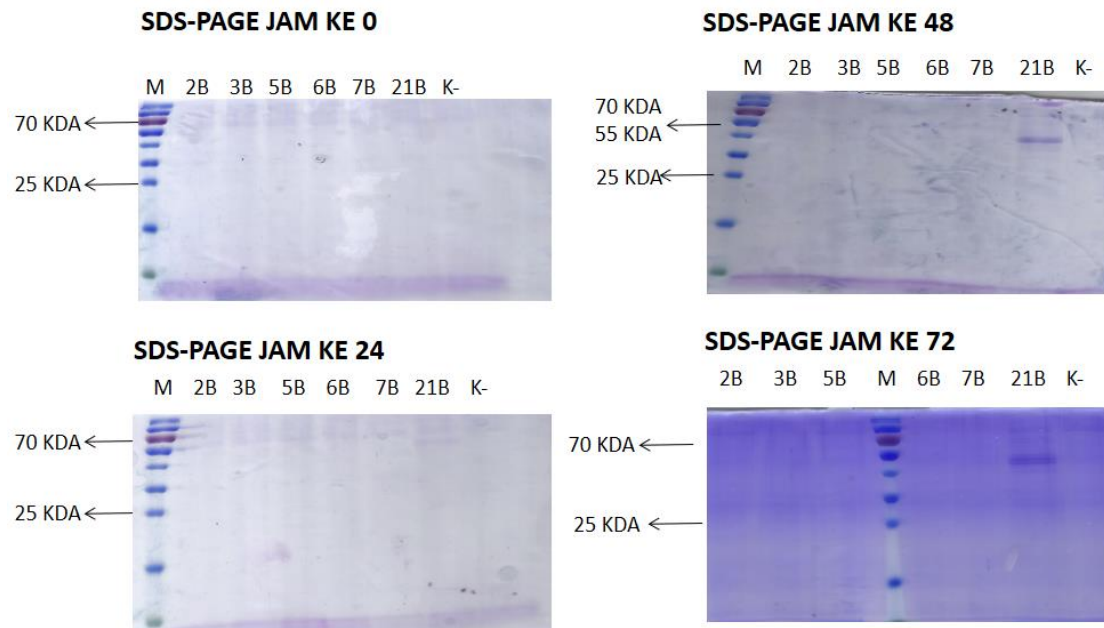
Untuk analisis protein intraselular, terdapat dua jenis perlakuan sampel. Kedua perlakuan tersebut yaitu:

1. Sonikasi 10 menit

Pellet yang sudah didapat ditambahkan dengan 500 µl PBS1X. Pellet kemudian dipecahkan dengan metode sonikasi selama 10 menit. Ambil 100 µl resuspensi pellet dan campur dengan 100 µl SDS Loading dye 6x. Resuspesi kedua larutan tersebut dan rebus dalam air mendidih selama 10 menit. Sampel siap untuk dianalisis dengan SDS-PAGE dan western blot.

2. Breaking pellet dengan LiAc 2M dan NaOH 0.4 M

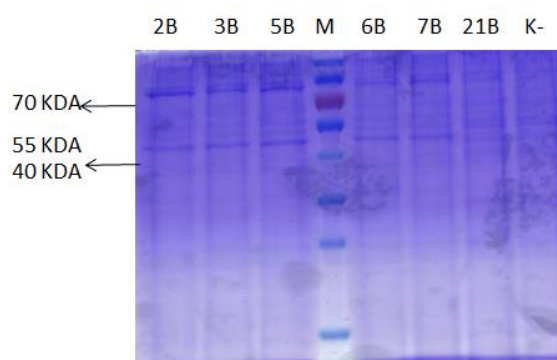
Ambil pellet dari kultur 1 ml, dan campur dengan 200 µl LiAc 2M. Inkubasi pellet di atas es selama 5 menit, dan kemudian sentrifugasi pellet kecepatan 5000 rpm selama 5 menit pada suhu 4°C. Buang supernatant, dan tambahkan pellet kembali dengan 200 µl NaOH 0,4 M. Inkubasi kembali pellet di atas es selama 5 menit, dan kemudian sentrifugasi kecepatan 5000 rpm selama 5 menit pada suhu 4°C. Buang supernatant, dan tambahkan 100 µl SDS Loading dye 6x pada pellet. Rebus pellet selama 10 menit pada air mendidih. Sampel siap untuk dianalisis dengan SDS-PAGE dan western blot. Berikut merupakan visualisasi analisis protein pr-ME pada SDS-PAGE dari supernatant kultur pada jam ke 0, 24, 48, dan 72:



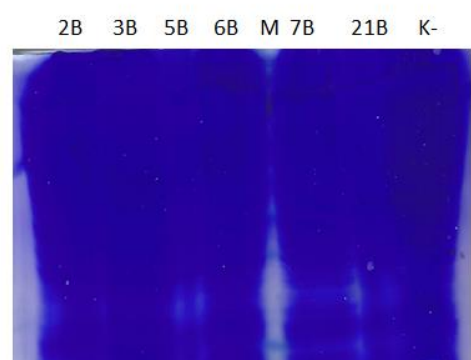
Gambar 50 Visualisasi pita protein pr-ME jam ke 0, 24, 48, dan 72 pada SDS-PAGE

Berdasarkan hasil SDS-PAGE di atas, diketahui bahwa pada jam ke 0 dan 24, belum ada ekspresi protein pr-ME ekstraselular yang dihasilkan. Namun, pada jam ke 48 dan 72, terlihat 1 koloni, yaitu sampel NO. 21B yang diduga mengeskripsi protein pr-ME ekstraselular. Sayangnya, pita protein yang terlihat tidak sesuai dengan prediksi berat molecular protein pr-ME (56 KDA). Selain itu, analisis terhadap pellet (protein internal) dengan dua perlakuan sampel (Sonikasi dan LiAc 2 M + NaOH 0.4 M) menghasilkan visualisasi pita protein sebagai berikut:

a. Sonikasi pellet (10 min)



b. LiAc 2M + NaOH 0.4 M

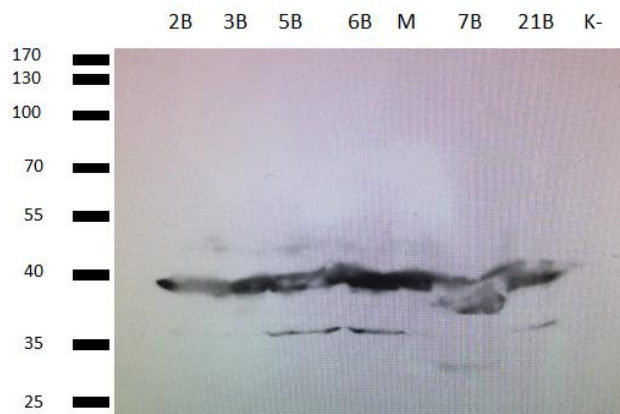


Gambar 51 Visualisasi pita protein internal sampel jam ke 72 pada SDS-PAGE

Berdasarkan visualisasi tersebut, tidak diketahui adanya pita protein pr-ME baik di sampel yang diberi perlakuan sonikasi dan LiAc 2 M + NaOH 0.4 M. Sampel yang diberi perlakuan LiAc 2 M + NaOH 0.4 M juga tidak menunjukkan gambaran pita yang jelas. Sehingga perlu dilakukan pengenceran sampel sebelum dilakukan SDS-PAGE dan western

blot. Analisis selanjutnya, akan dilakukan dengan western blot. Antibodi primer yang digunakan adalah Rabbit polyclonal antibody to pr-M (1: 5000) dan antibodi kedua, yaitu goat polyclonal to Rb IgG HRP (1:10.000).

Antibodi 1: Rabbit polyclonal antibody to PrM (1:5.000)
 Antibodi 2: Goat pAB to Rb IgG HRP (1:10.000)
 Substrat : Pierce ECL plus western blot substrate



Gambar 52 Hasil western blot sampel pellet (LiAc 2 M + NaOH 0.4 M) jam ke 72 dengan anti- Pr-M

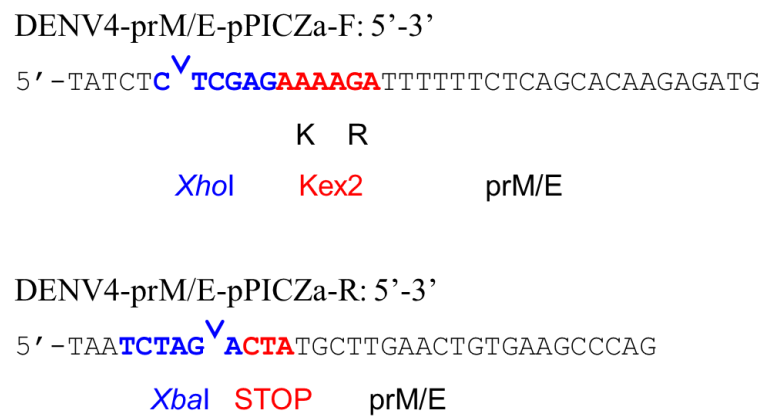
Berdasarkan hasil western blot sampel LiAc 2 M + NaOH 0.4 M jam ke 72, diketahui bahwa sampel no 5B, 6B, dan 21B menunjukkan adanya pita protein sebesar $\pm$ 35 KDA. Besar protein tersebut tidak sesuai dengan prediksi protein rekombinan pr-ME yang memiliki besar 56 KDA. Sejauh ini, belum diketahui mengapa pita protein tersebut tidak sesuai dengan target. Namun, dugaan yang mungkin terjadi adalah terdegradasinya protein, atau auto cleavage protein di dalam sel menyebabkan protein berukuran lebih kecil. Pada tahapan selanjutnya, diperlukan control positif Pr-M / Envelope yang dapat digunakan untuk menilai kualitas western blot selama penelitian.

5.3 PENELITIAN DI LEMBAGA BIOLOGI MOLEKULER EIJKMAN

1. Desain primer untuk kloning gen prM/E DENV-4 pada vektor ekspresi *Pichia pastoris*

Kandidat vaksin dibuat berdasarkan konsep *sub unit vaccine* gen prM/E. Metode kloning telah disepakati dibuat seragam menggunakan vektor ekspresi *P. pastoris*. Untuk melakukan proses kloning gen prM/E DENV-4 isolat 081, dilakukan desain primer untuk amplifikasi gen prM/E dan menambahkan berbagai fitur/karakteristik yang bermanfaat dalam

proses utama maupun proses lanjutan dari kloning. Desain primer yang dibuat adalah sebagaimana disajikan pada Gambar 53.



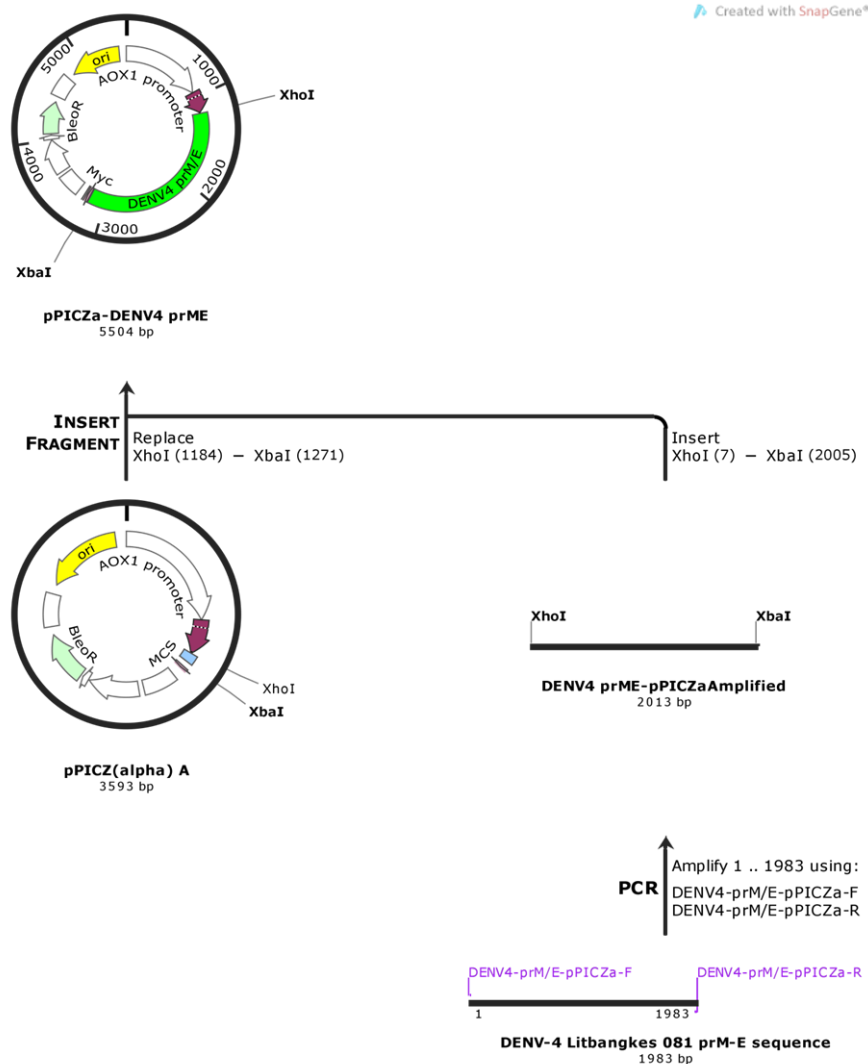
Gambar 53 Gambaran skematik sepasang primer yang didesain untuk kloning gen prM/E DENV-4 ke vektor ekspresi *P. pastoris*.

Dalam desain primer ini, ditambahkan beberapa fitur sebagai berikut:

1. Penambahan situs enzim restriksi XhoI dan XbaI.
2. Penambahan sekuen pengenalan Kex2 protease (Lys-Arg/X) untuk eliminasi protein α -factor (faktor sekresi protein rekombinan) pada proses *downstream*.
3. Penambahan STOP codon pada ujung 3' untuk eliminasi ekspresi gen *Myc* dan 6XHis yang terkandung dalam vektor plasmid pPICZa-A.

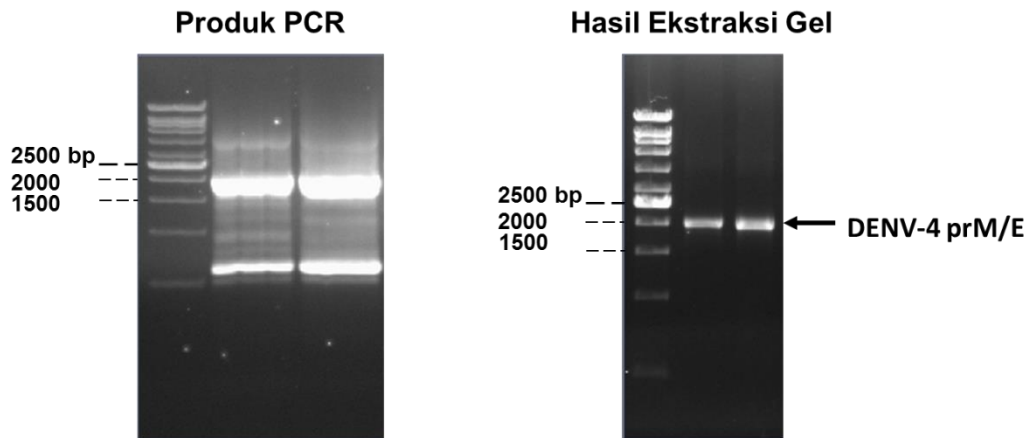
2. Kloning gen prM/E DENV-4 pada vektor ekspresi *Pichia pastoris*

Telah dilakukan amplifikasi gen prM/E dari DENV-4 isolat Indonesia untuk dikloning ke dalam vektor ekspresi pPICZa. Alur kerja untuk aktivitas kloning adalah seperti pada Gambar 54.



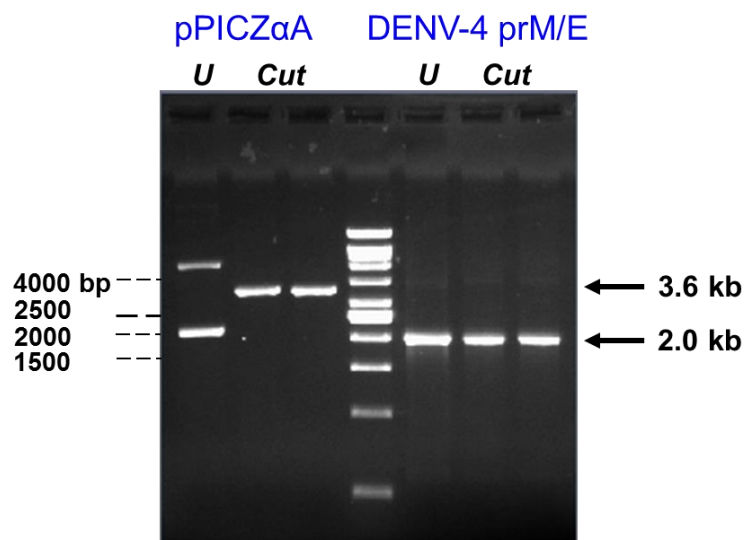
Gambar 54 Alur kerja aktivitas kloning gen prM/E DENV-4 ke dalam plasmid pPICZa.

Amplifikasi gen prM/E dilakukan menggunakan primer yang menyisipkan situs restriksi *XhoI* and *XbaI* pada ujung-ujung gen prM/E. Hasil amplifikasi PCR adalah seperti pada Gambar 55.



Gambar 55 Hasil amplifikasi PCR gen prM/E DENV-4 yang akan diklon ke dalam vektor ekspresi pPICZ α A.

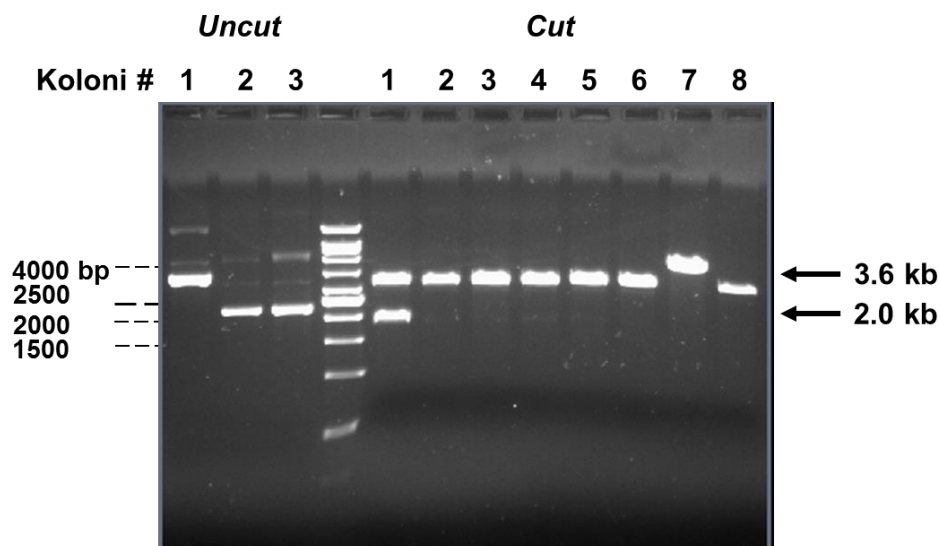
Tahapan kloning kemudian dilanjutkan dengan penyiapan sisipan dan vektor plasmid dengan restriksi enzim *XhoI* dan *XbaI*. Hasil proses restriksi kemudian divisualisasi pada gel agarosa, sebagaimana ditunjukkan pada Gambar 56. Hasil restriksi menunjukkan pita tunggal DNA sisipan prM/E DENV-4 sebesar ~2 kb dan vektor plasmid linier sebesar ~3,6 kb.



Gambar 56 Restriksi enzimatik sisipan gen prM/E DENV-4 dan vektor plasmid pPICZ α A sebelum restriksi (uncut/U) dan sesudah restriksi (cut).

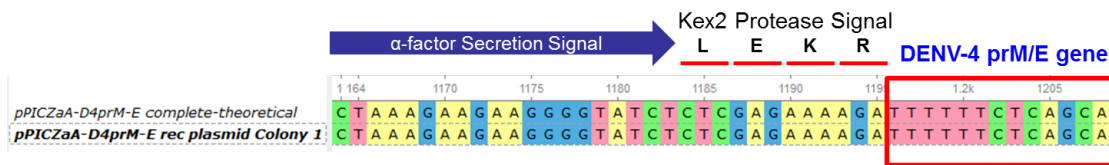
Setelah dipastikan bahwa vektor dan sisipan telah terpotong dengan optimal, tahapan kloning dilanjutkan dengan reaksi ligasi menggunakan enzim T4 DNA Ligase pada suhu 16°C selama lebih kurang 18 jam. Hasil ligasi kemudian ditransformasikan ke sel kompeten *Escherichia coli* DH5 α dengan penapisan antibiotik Zeocin. Transformasi produk ligasi pada sel

kompeten *E. coli* DH5 α menghasilkan 44 koloni. Untuk memastikan keberhasilan proses ligasi, dilakukan ekstraksi DNA plasmid rekombinan menggunakan metode minipreparasi. DNA hasil ekstraksi kemudian diperiksa menggunakan metode pemotongan enzim restriksi *XhoI* dan *XbaI*. Penapisan dengan enzim restriksi pada 8 koloni yang dipilih secara acak memberikan hasil koloni # 1 yang mengandung sisipan gen prM/E DENV-4 (Gambar 57).

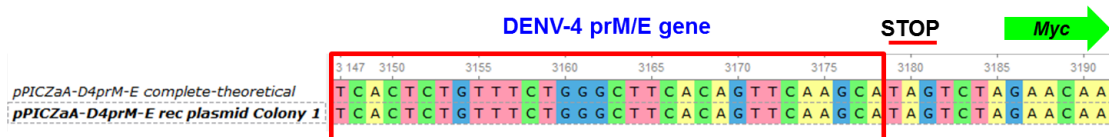


Gambar 57 Hasil pemeriksaan koloni yang mengandung plasmid rekombinan sebelum (uncut) dan sesudah (cut) digesti enzim restriksi. Dari 8 koloni yang diperiksa, tampak koloni no. 1 mengandung plasmid rekombinan ditandai dengan keberadaan dua pita DNA yang menunjukkan vektor (3,6 kb) dan sisipan prM/E DENV-4 (2 kb).

Plasmid DNA rekombinan dari koloni no. 1 kemudian diverifikasi kesesuaian basa penyusun nya menggunakan sekuensing. Sekuensing lengkap gen prM/E dan juga posisi *flanking* lokasi penyisipan memberikan hasil bahwa gen prM/E telah tersisip dengan optimal dalam vektor pPICZ α A dengan fitur-fitur yang diinginkan telah sesuai (Gambar 58). Sedikit catatan dari hasil sekuensing gen prM/E lengkap, terdapat *silent mutation* pada posisi C486T, namun mutasi ini tidak merubah susunan asam amino/codon yang terbentuk.



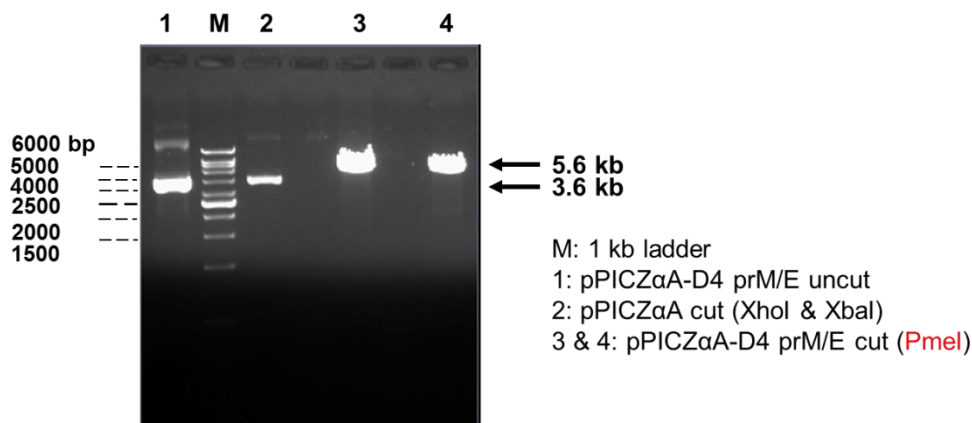
Inseri gen DENV-4 prM/E yang *in-frame*



Kodon STOP pada ujung 3'

Gambar 58 Gambaran skematis hasil sekuensing plasmid rekombinan pPICZαA mengandung sisipan gen prM/E DENV-4 yang menunjukkan fitur yang didesain telah terimplementasi dengan baik.

Plasmid rekombinan yang telah terverifikasi kemudian di-linierisasi menggunakan restriksi enzim *PmeI*, menghasilkan pita tunggal DNA berukuran ~5,6 kb (Gambar 59).

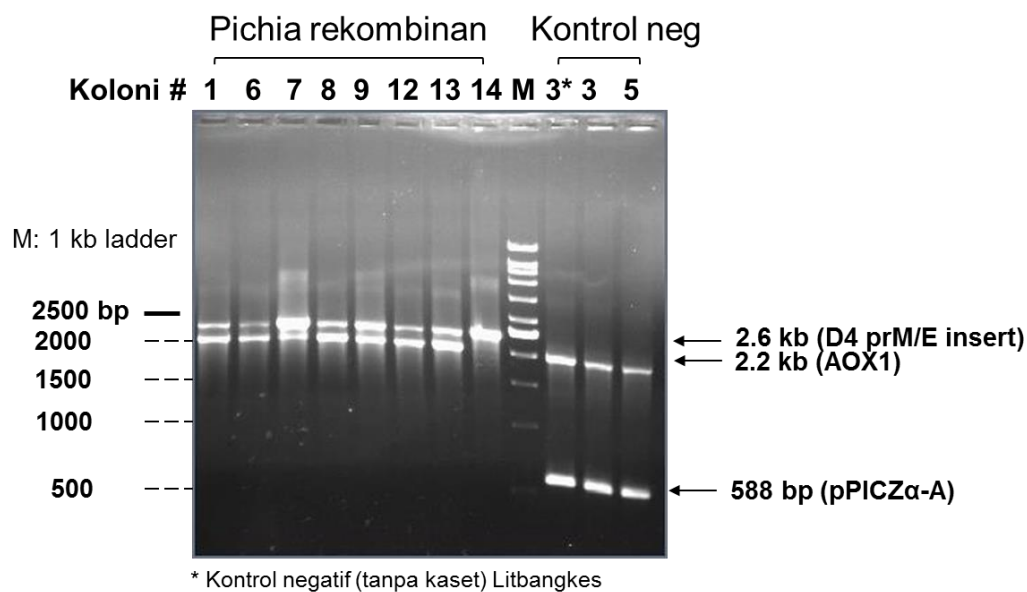


Gambar 59 Hasil linerisasi (cut) plasmid rekombinan pPICZαA-prM/E menggunakan enzim *PmeI*.

3. Transformasi plasmid rekombinan ke dalam *host P. pastoris*

Semua prosedur kerja dalam system *P. pastoris* dilakukan di Litbangkes. Plasmid rekombinan yang telah terverifikasi dan terkarakterisasi kemudian ditransformasikan ke dalam *host P. pastoris* kompeten menggunakan teknik elektroporasi. Transformasi plasmid rekombinan dilakukan pada strain GS115. Koloni yang tumbuh kemudian diperiksa untuk fenotipe integran yang dilakukan menggunakan metode PCR (di Eijkman) dan kultur (di Litbangkes).

Penapisan fenotipe dengan PCR dilakukan terhadap 16 koloni mengandung kaset (gen DENV4-prM/E) dan 7 koloni tanpa kaset (kontrol negatif, plasmid pPICZαA). Hasil penapisan PCR menunjukkan bahwa sebagian besar (87,5%) dari koloni berfenotipe Mut⁺. Menggunakan metode PCR dan primer AOX1, koloni Mut⁺ akan memberikan hasil amplifikasi berupa dua pita DNA berukuran ~2,6 kb (menandakan keberadaan sisipan gen prM/E DENV-4) dan ~2,2 kb (gen AOX1). Koloni tanpa kaset akan menghasilkan pita DNA berukuran 588 bp (kontrol plasmid pPICZαA) dan pita 2,2 kb tanpa adanya pita 2,6 kb (Gambar 60).



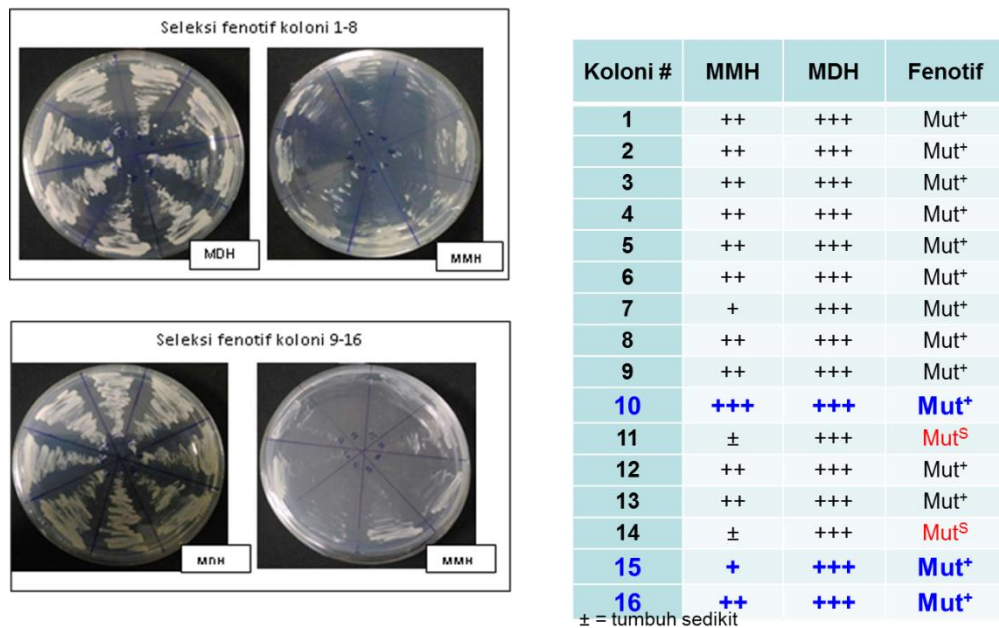
HASIL:

Fenotipe Mut⁺: koloni # 1, 6, 7, 8, 9, 12, 13

Fenotipe Mut^S: koloni # 14 ?

Gambar 60 Hasil penapisan fenotipe integran koloni *P. pastoris* mengandung sisipan gen prM/E DENV-4.

Penapisan fenotipe integran menggunakan media pertumbuhan dilakukan oleh tim Litbangkes. Hasil seleksi medium ditunjukkan pada Gambar 61. Hasil seleksi fenotipe menggunakan medium menjadi suatu konfirmasi dari hasil seleksi menggunakan PCR. Beberapa kandidat koloni kemudian dipilih untuk tahapan optimasi ekspresi protein, diantaranya koloni no. 10, 15, dan 16.

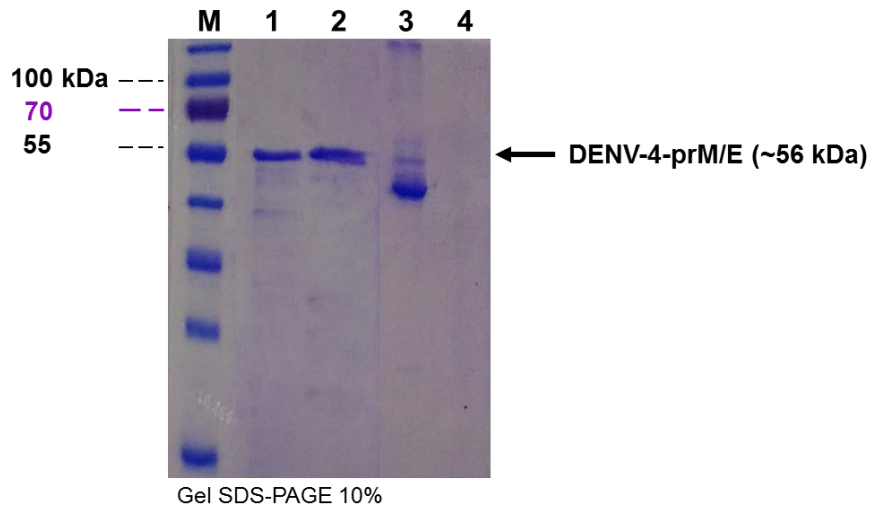


Gambar 61 Hasil seleksi fenotipe integran koloni *P. pastoris* mengandung sisipan gen prM/E DENV-4 menggunakan medium.

Sebagai penunjang dari karakterisasi integran, dilakukan sekuensing lengkap genom *Pichia* rekombinan khususnya pada posisi insersi gen prM/E DENV-4. Hasil sekuensing menunjukkan tidak terjadi perubahan pada basa maupun fitur kloning yang telah ditambahkan. Sehingga diharapkan ekspresi protein dapat menghasilkan protein dalam bentuk tersekresi (*soluble*).

4. Ekspresi protein rekombinan prM/E DENV-4 pada sistem *P. pastoris*.

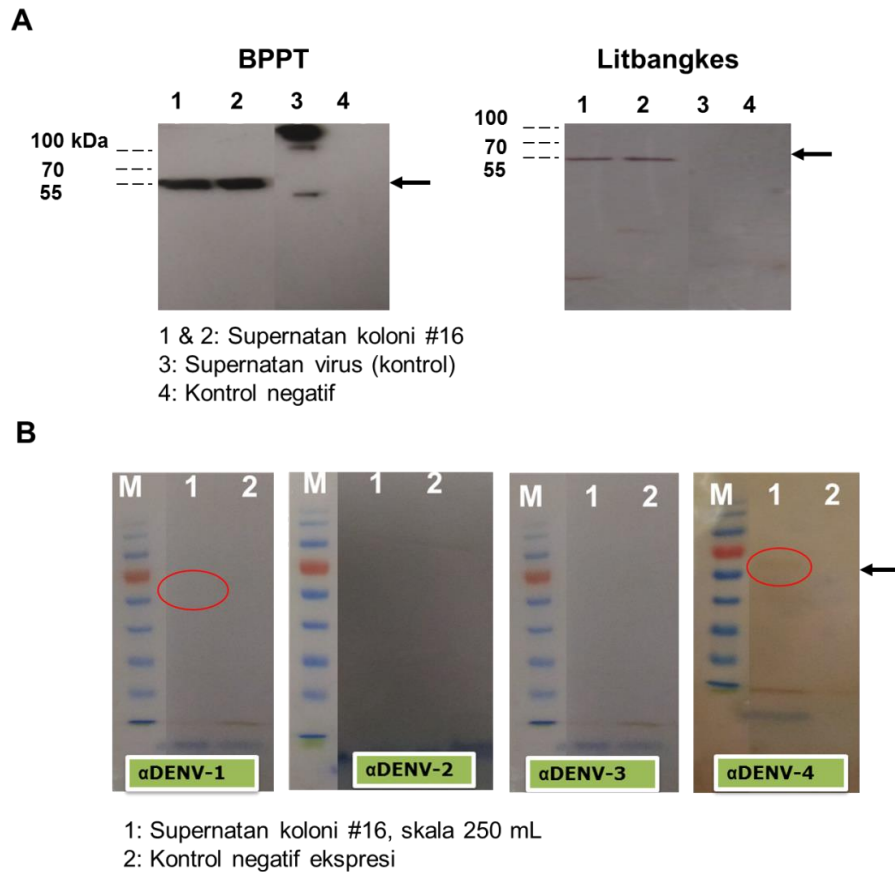
Optimasi metode ekspresi protein juga dilakukan oleh tim Litbangkes. Hasil untuk percobaan ekspresi protein dari koloni kandidat no. 16, skala lab 250 mL, induksi 2% methanol setiap 24 jam, sampling 72 jam menunjukkan pita protein berukuran ~56 kDa (Gambar 62). Hasil ini memberikan gambaran ekspresi protein prM/E DENV-4 dalam bentuk tersekresi di supernatant.



Gambar 62 Hasil SDS-PAGE ekspresi protein sampel supernatant *Pichia* rekombinan (lajur 1 dan 2) dan kontrol positif supernatant virus dengue (lajur 3), serta kontrol negatif *Pichia* tanpa kaset (lajur 4).

5. Karakterisasi protein rekombinan prM/E DENV-4

Karakterisasi protein rekombinan prM/E DENV-4 dilakukan menggunakan metode Western Blot. Protein rekombinan (berukuran ~56 kDa) dideteksi menggunakan antibodi spesifik anti prM dan anti prM/E spesifik serotipe dan tetraavalen (Gambar 63). Hasil Western Blot menunjukkan bahwa protein rekombinan yang dihasilkan terkarakterisasi sebagai protein prM/E DENV-4.



Gambar 63 Hasil karakterisasi protein rekombinan prM/E DENV-4 menggunakan antibodi anti prM (A) yang dikerjakan di BPPT dan Litbangkes, dan menggunakan antibodi anti prM/E (B). Tanda panah menunjukkan posisi pita protein prM/E berukuran ~56 kDa.

5.4 PENELITIAN DI FK UNIVERSITAS GADJAH MADA

A. Persiapan amplifikasi gen prM/E DENV1-073 dengan PCR.

Pada penelitian tahap terdahulu sudah dilakukan amplifikasi gen PrM/E DENV1 isolat nomer D1-073. Selanjutnya telah berhasil dilakukan penyusunan konstruk gen PrM/E di dalam plasmid pGEMT yang dimasukkan ke dalam *E. Coli* DH5α (pGEMT-PrM/E DENV1-073). . Selanjutnya dilakukan pemindahan gen PrM/E DENV1 ke dalam vektor pET32 (pET32-PrM/E DENV1-073 untuk diekspresikan pada sistem ekspresi *E. coli* BL21 DE3.

Pada tahap ini dilakukan persiapan gen PrM/E DENV1 isolat nomer D1-073 dengan PCR menggunakan template gen PrM/E dari konstruk yang telah masuk di dalam pGEMT (pGEMT-PrM/E DENV1-073).

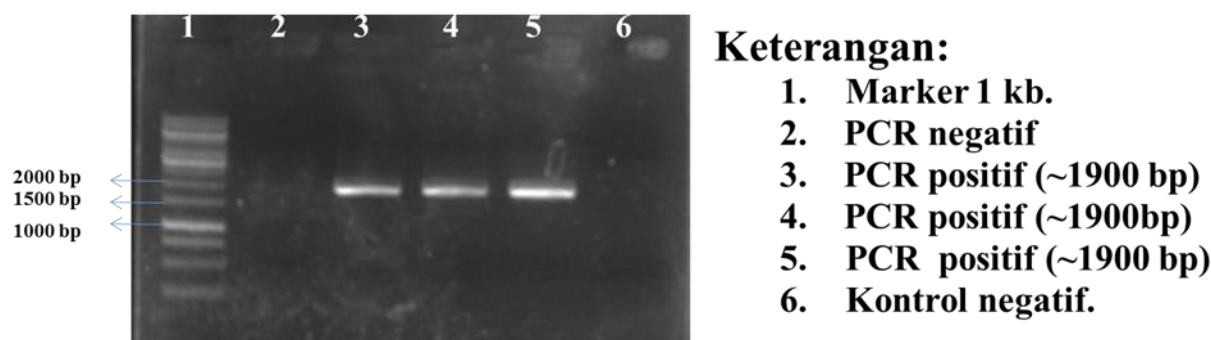
- Racikan PCR yang digunakan adalah:

ddH ₂ O	: 23 ul
2x Phusion Mix	: 25 ul
Primer Reverse DENV I (10uM)	: 0,5 ul
Primer Forward DENV I (10 uM)	: 0,5 ul
DNA	: 1 ul
Total	: 50 ul

- Program PCR yang digunakan adalah:

Initial denaturasi	: 98 ⁰ C 30 detik	} 35 siklus
Denaturasi	: 98 ⁰ C 10 detik	
Annealing	: 57 ⁰ C 30 detik	
Extention	: 72 ⁰ C 1 menit	
Final extention	: 72 ⁰ C 5 menit	
Hold	: 42 ⁰ C ~	

Elektroforesis dari hasil PCR dapat dilihat pada Gambar 64. di bawah ini.



Gambar 64 Elektroforesis hasil PCR gen PrM/E DENV1-073 dengan template konstruk pGEMT-PrM/E DENV1-073

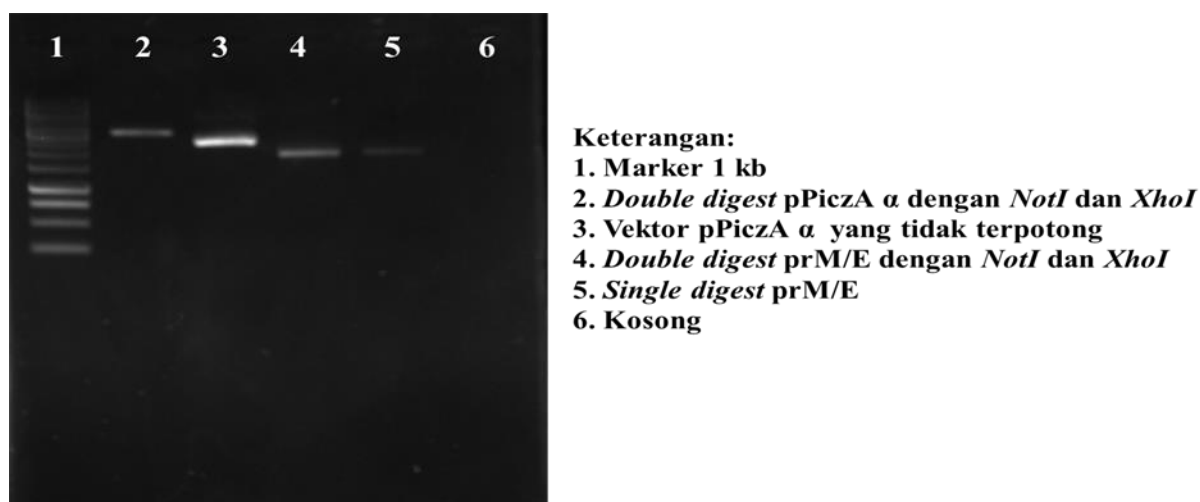
Langkah selanjutnya yang dilakukan adalah purifikasi hasil PCR dengan menggunakan kit PrimePrep PCR Purification Kit dari GeNet Bio Cat.no K-7001

B. Pemotongan vektor dan gen PrM/E

Pengukuran konsentrasi hasil purifikasi produk PCR telah dilakukan dan didapatkan hasil 67,30 ng/ul. Setelah dilakukan pemeriksaan konsentrasi dengan menggunakan Nanodrop, maka langkah selanjutnya adalah pemotongan dengan menggunakan enzim restriksi. Pemotongan yang akan dilakukan sebanyak 2 kali, pertama pemotongan dengan menggunakan enzim *XhoI* lalu dilanjutkan dengan proses pemotongan yang kedua dengan menggunakan enzim *NotI*. Dalam prosedur pemotongan dengan dua ezim ini dilakukan purifikasi bertahap yang dilakukan setiap kali prosedur pemotongan dengan enzim dan inaktivasi enzim selesai dilakukan. Dicoba pula untuk melakukan pemotongan dengan dua enzim secara bersama-sama untuk optimasi.

Untuk menyiapkan vektor pPiczA α dilakukan pemotongan dengan menggunakan dua enzim yang sama dengan enzim yang digunakan untuk memotong gen target. Setelah dilakukan pemotongan, dilakukan pula purifikasi serupa dengan prosedur yang dilakukan pada gen target.

Elektroforesis dari hasil pemotongan dengan enzim tunggal (*single digest*) dan enzim ganda (*double digest*) dapat dilihat pada gambar 65,



Gambar 65 Elektroforesis hasil pemotongan vektor pPiczA α dan gen target PrM/E DENV1-073 dengan enzim *NotI* dan *XhoI*.

Gambar 2 mengindikasikan bahwa pemotongan terhadap vektor pPiczA α dan gen target PrM/E DENV1 dengan enzim *NotI* dan *XhoI* telah berhasil dilakukan. Hasil yang lebih bagus didapatkan ketika dilakukan pemotongan langsung dengan menggunakan dua enzim secara bersama-sama. Hal ini dikarenakan ketika pemotongan menggunakan dua enzim sekaligus akan mengurangi proses purifikasi yang dilakukan, sehingga peluang turunnya konsentrasi dapat dicegah. Setelah proses pemotongan berhasil dilakukan, maka langkah selanjutnya yang akan ditempuh adalah melakukan proses ligasi gen target PrM/E DENV1-073 ke dalam vektor pPiczA α .

C. Persiapan pembuatan sel kompeten dan proses ligasi

Setelah vektor dan gen target selesai disiapkan maka perlu dilakukan pembuatan kompeten sel untuk proses ligasi dan transformasi. Proses ligasi dan transformasi akan menggunakan sel kompeten *E.coli* TOP 10. Untuk ligasi dilakukan beberapa optimasi termasuk membandingkan perbandingan antara vektor dan gen target, seperti terlihat pada Tabel 7.

Tabel 7 Optimasi perbandingan vektor dan gen target untuk proses ligasi

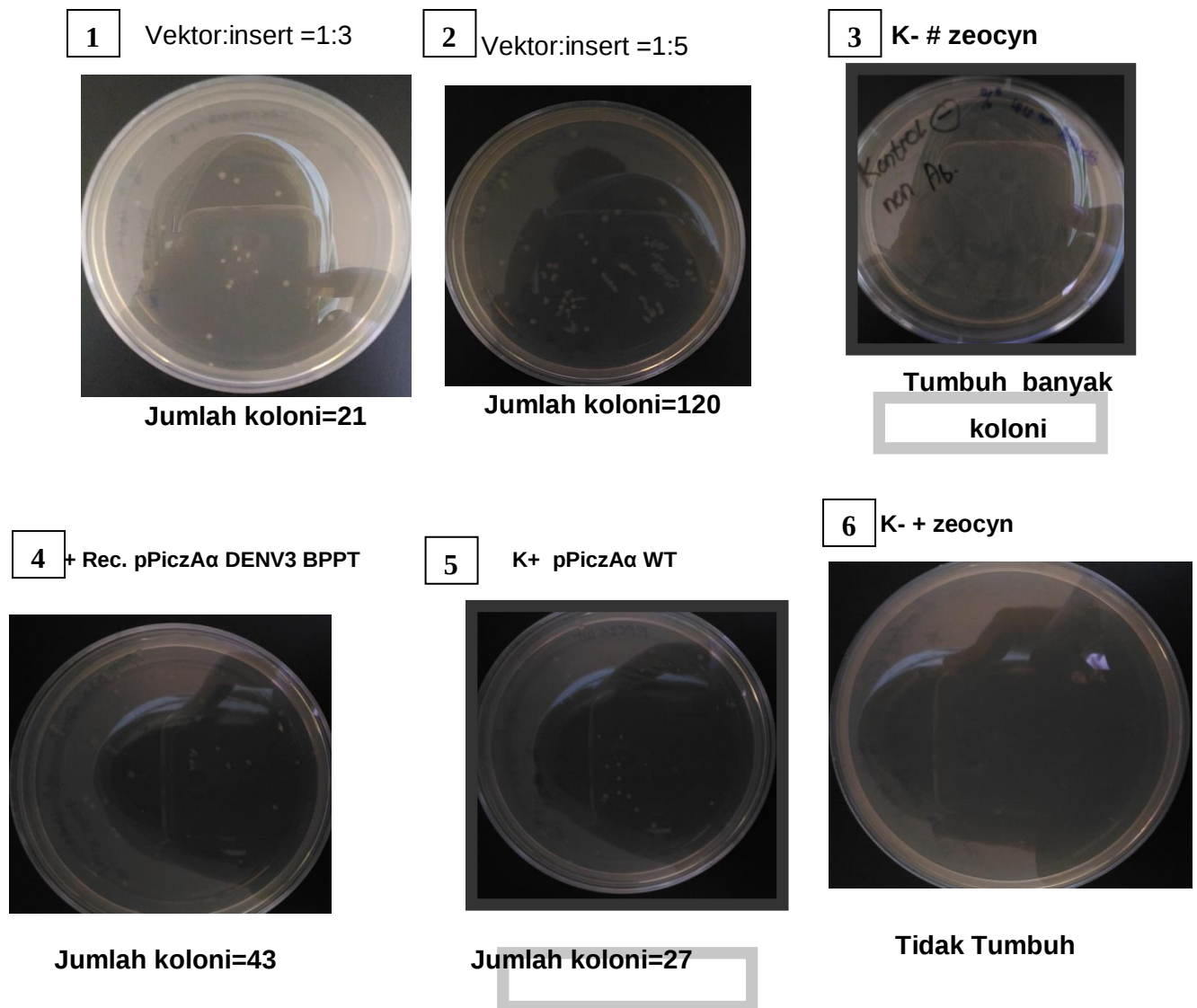
Proses ligasi		
Perbandingan ligasi	1:3	1:5
Vektor pPiczAα	5 ul (27ng x 5ul = 135ng)	5 ul (27ng x 5ul = 135ng)
Insert prM/E	13 ul (23ng x 13ul = 299ng)	21 ul (23ng x 21ul = 483 ng)
Enzim T4 DNA ligase	2 ul	2 ul
Buffer ligase	2 ul	2 ul
ddH ₂ O	28 ul	20 ul
Total	50 ul	50 ul

D. Transformasi dengan metode *heat shock*

Pada proses transformasi dilakukan optimasi untuk meningkatkan kemungkinan keberhasilan. Oleh karenanya dilakukan proses transformasi dengan sampel sebagai berikut:

1. Sel kompeten + sampel ligasi 1:3
2. Sel kompeten + sampel ligasi 1:5
3. Kontrol positif = sel kompeten + pPiczAα WT
4. Kontrol positif = sel kompeten pPiczAα nomor 8 yang telah rekominan DENV 3 milik BPPT
5. Kontrol negatif yang hanya mengandung sel kompeten yang disebarkan pada media agar yang tidak mengandung zeocyn
6. Kontrol negatif yang hanya mengandung sel kompeten yang disebarkan pada media agar yang mengandung zeocyn

Hasil dari transformasi dengan metode *heat shock* kemudian ditanam di atas media padat untuk melihat adanya pertumbuhan sel kompeten. Hasil biakan sel kompeten yang telah ditransformasi dapat dilihat pada Gambar 66 dan jumlah koloni pertumbuhan sel kompeten dirangkum pada Tabel 8.



Gambar 66 Hasil biakan sel kompeten untuk hasil transformasi

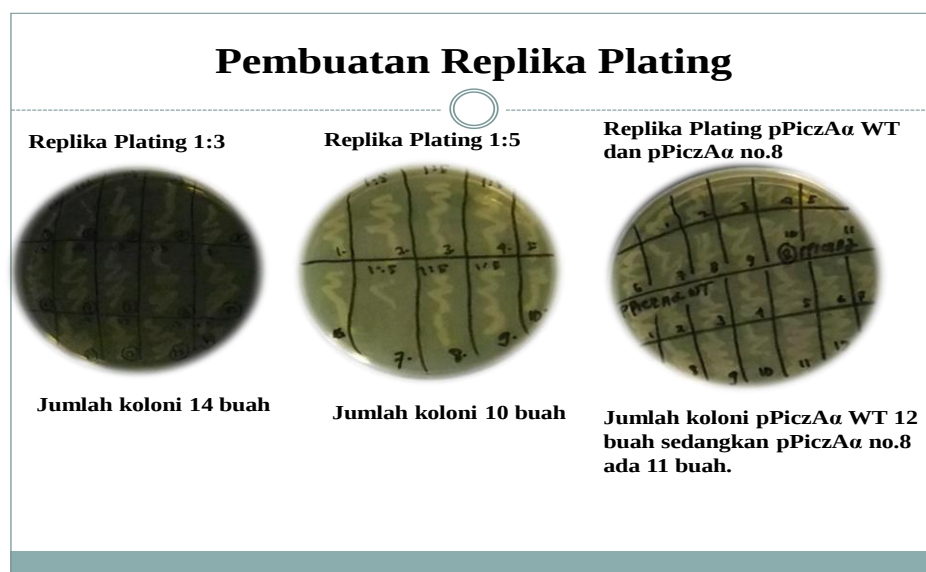
Tabel 8 Rangkuman hasil transformasi yang telah dilakukan.

No	Hasil ligasi	Hasil transformasi	Jumlah koloni yang diuji
1	Vektor:Insert= 1:3	21 koloni	14
2	Vektor:Insert= 1:5	120 koloni	10
3	Kontrol negatif (tanpa zeocyn)	Tumbuh	
4	Kontrol positif (+ zeocyn)	43 koloni	

5	K+ Rec. pPiczA α DENV3 BPPT	27 koloni	
6	K+ pPiczA α <i>Wild Type</i>	Tidak tumbuh	

E. Pembuatan *replica plating*

Tahap selanjutnya adalah membuat *replica plating* dari masing-masing petri untuk persiapan proses selanjutnya. Selain itu, dilakukan pembuatan stok gliserol dari masing-masing koloni yang disimpan pada freezer -80°C (Gambar 67).



Gambar 67 Hasil pembuatan *replica plate*.

F. Isolasi plasmid hasil transformasi .

Setelah tahap transformasi berhasil dilakukan maka tahap selanjutnya dilakukan isolasi plasmid rekombinan pPiczA α -PrM/E DENV1-073. Telah dilakukan biakan sel transforman pada medium LBLS cair pH 7,5 + zeocyn 25 ug/ml. Isolasi plasmid dilakukan dengan menggunakan kit GeneJet plasmid Miniprep Kit Thermo scientific Cat.no #K0502. Hasil isolasi plasmid dilakukan pengukuran konsentrasi DNA dengan nanodrop untuk masing-masing koloni (Tabel 9 dan 10). Sementara hasil elektroforesis plasmid dapat dilihat pada Gambar 68 dan 69.

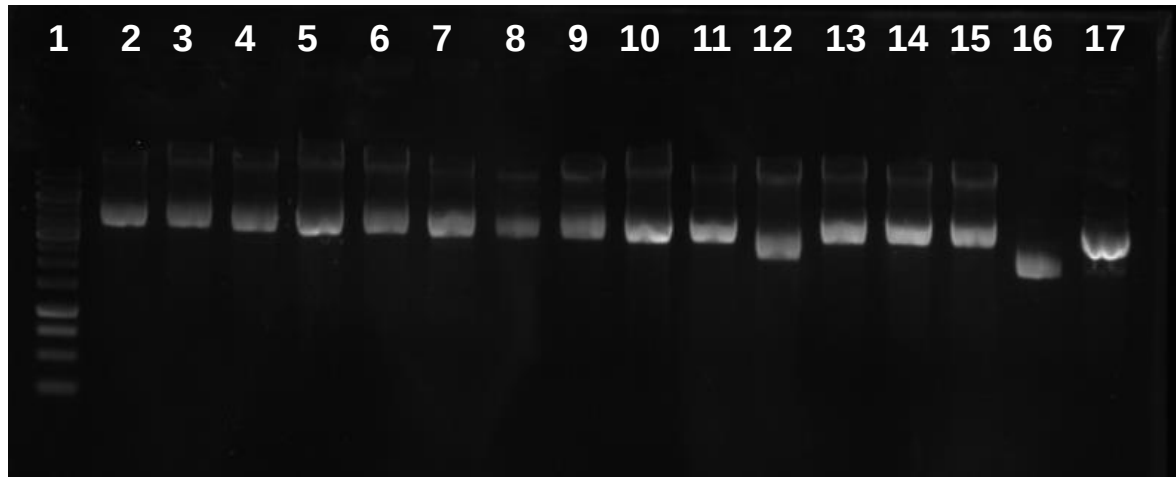
Tabel 9 Hasil pengecekan konsentrasi isolasi DNA plasmid rekombinan hasil transformasi dengan perbandingan ligasi vektor : gen target 1:3

Nomor koloni	Konsentrasi DNA (ng/ul)	A260/280
1	324,7	1,807
2	424,3	1,803
3	236,8	1,868
4	512,9	1,873
5	339,2	1,882
6	311,0	1,896
7	219,8	1,932
8	290,7	1,891
9	457,2	1,880
10	237,5	1,939
11	220,0	1,913
12	291,3	1,913
13	310,8	1,909
14	315,6	1,894

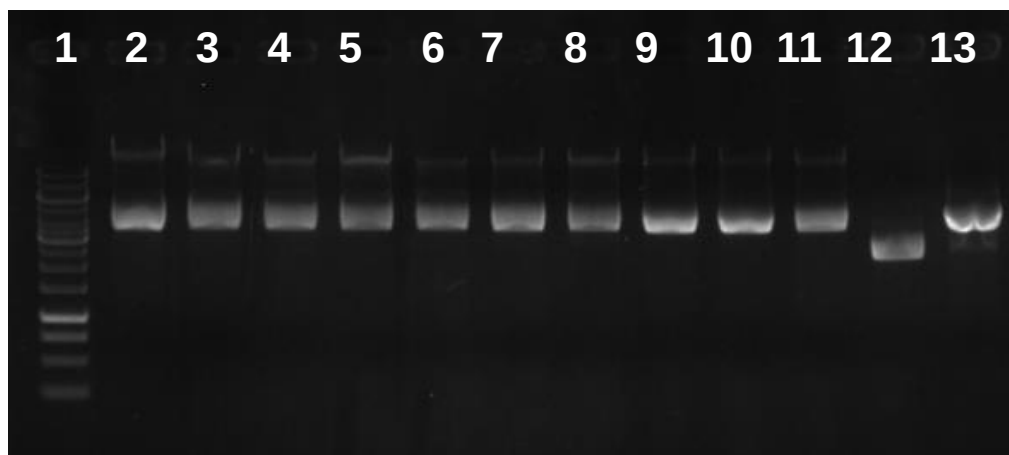
Tabel 10 Hasil pengecekan konsentrasi isolasi DNA plasmid rekombinan hasil transformasi dengan perbandingan ligasi 1:5

Nomor koloni	Konsentrasi DNA (ng/ul)	A260/280
1	317,0	1,910
2	123,8	2,106
3	108,8	2,100
4	115,8	2,076
5	98,63	2,210
6	148,3	2,023
7	134,7	2,050
8	207,6	1,966
9	208,4	1,978
10	104,4	2,157

Gambar 68 dan 69 menunjukkan adanya pita yang tampak jelas mengindikasikan keberadaan konstruk pPiczA α -PrM/E-DENV1-073 pada setiap koloni. Hasil tersebut dapat diamati pada transformasi dengan perbandingan ligasi vektor: target 1:3 maupun vektor: target 1:5.

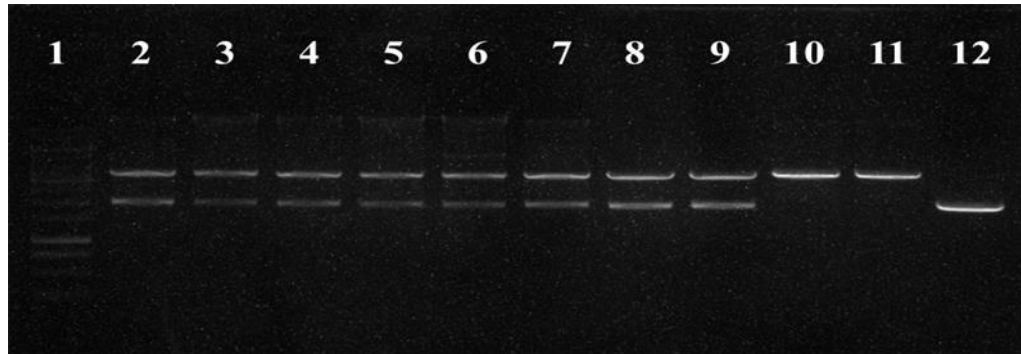


Gambar 68 Elektroforesis plasmid pPiczA α - PrM/E-DENV1 yang diisolasi dari sel *E. coli* TOP 10 dengan perbandingan ligasi 1;3.. Lajur 1: Marker 1kb; Lajur 2-15: plasmid dengan perbandingan ligasi 1:3 untuk koloni 1-14; Lajur 16: Isolasi plasmid pPiczA α WT sebagai control; dan lajur 17: Isolasi plasmid pPiczA α -PrM/E-DENV3 recombinan sebagai kontrol positif.

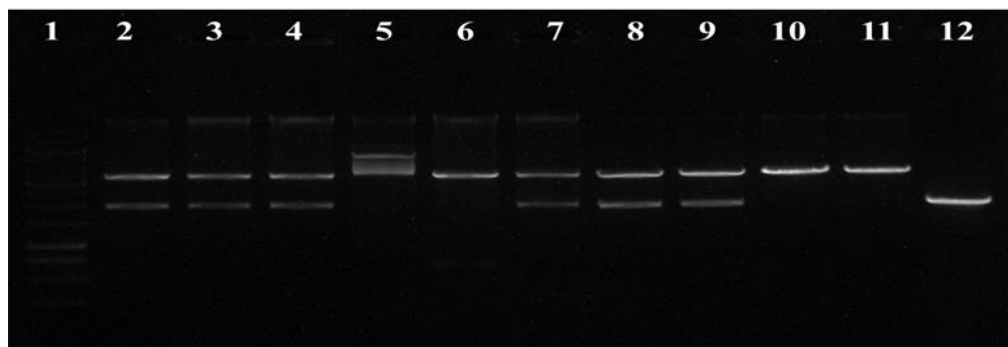


Gambar 69 Elektroforesis plasmid pPiczA α - PrM/E-DENV1 yang diisolasi dari sel *E. coli* TOP 10 dengan perbandingan ligasi 1;5. Lajur 1: Marker 1 kb; Lajur 2-11: plasmid dengan perbandingan ligasi 1:5 koloni nomor 1-10; Lajur 12: plasmid pPiczA α WT sebagai control; Lajur13: plasmid pPiczA α - PrM/E-DENV3 sebagai kontrol.

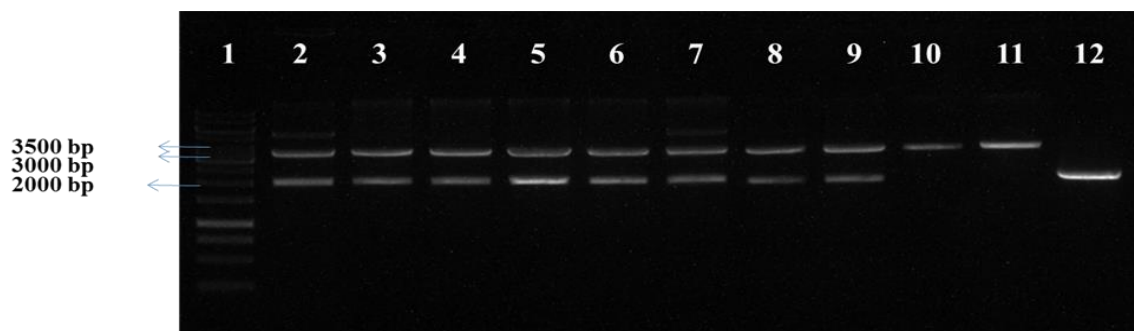
Tahap penelitian selanjutnya adalah mengkonfirmasi keberadaan konstruk pPiczA α -PrM/E-DENV1 pada sel transforman dengan cara melakukan pemotongan enzim restriksi. Hasil pemotongan dengan menggunakan enzim *XhoI* dan *NotI* dapat dilihat pada Gambar 70, 71, dan 72. Gambar 70 memperlihatkan hasil ligasi perbandingan vektor; target 1:3 dan Gambar 71 untuk ligasi dengan perbandingan vektor:target 1:5.



Gambar 70 Elektroforesis pemotongan konstruk pPiczA α -PrM/E-DENV1 dengan enzim *XhoI* dan *NotI* dari hasil transforman ligasi dengan perbandingan vektor: target 1 : 3. . Lajur: 1: Marker 1 kb; Lajur 2-7: *Double digest* transformasi 1:3 nomor koloni 1-6; Lajur 8: . *Double digest* pPiczA α - PrM/E-DENV3 nomor 8 milik BPPT dengan *Eco721* dan *XbaI* masing-masing 0,5 ul (sebagai kontrol positif); Lajur 9: *Double digest* pPiczA α - PrM/E-DENV3 nomor 8 milik BPPT dengan *Eco721* dan *XbaI* masing-masing 1 ul (sebagai kontrol positif); Lajur 10: *Double digest* pPiczA α WT dengan *NotI* dan *XhoI* sebagai kontrol ; Lajur 11: *Double digest* pPiczA α WT dengan *Eco721* dan *XbaI* sebagai kontrol positif; dan Lajur 12: Hasil PCR prM/E DENV1.



Gambar 71 Elektroforesis pemotongan konstruk pPiczA α -PrM/E-DENV1 dengan enzim *XhoI* dan *NotI*. Lajur 1: Marker 1 kb; Lajur 2-3: Ligasi 1:3 koloni nomor 13-14 dengan *XhoI* dan *NotI*; Lajur 4-7: Ligasi 1:5 koloni nomor 1-4 dengan *XhoI* dan *NotI*; Lajur 8 pPiczA α -rec no. 8 milik BPPT dengan *Eco721* dan *XbaI* @ 0,5 ul (kontrol positif); Lajur 9: pPiczA α -rec no. 8 milik BPPT dengan *Eco721* dan *XbaI* @ 1 ul (kontrol positif); Lajur 10: pPiczA α WT dengan *NotI* dan *XhoI* (kontrol) ; Lajur 11: pPiczA α WT dengan *Eco721* dan *XbaI* (kontrol +); dan lajur 12: Hasil PCR prM/E



Gambar 72 Elektroforesis pemotongan konstruk pPiczA α -PrM/E-DENV1 dengan enzim XhoI dan NotI. Lajur 1: Marker 1 kb; Lajur 2-7: Ligasi 1:5 koloni nomor 5-10 dengan XhoI dan NotI; Lajur 8: pPiczA α -rec no. 8 milik BPPT dengan Eco721 dan XbaI @ 0,5 ul (sebagai kontrol +); Lajur 9: pPiczA α -rec no. 8 milik BPPT dengan Eco721 dan XbaI @ 1 ul (sebagai kontrol +); Lajur 10: pPiczA α WT dengan NotI dan XhoI sebagai kontrol; Lajur 11: pPiczA α WT dengan Eco721 dan XbaI sebagai kontrol +); dan lajur 12: Hasil PCR prM/E.

Data elektroforesis diatas menunjukkan bahwa dari 14 koloni yang ditransformasi dengan perbandingan 1:3, hanya ada 12 koloni yang memberikan hasil pemotongan yang sesuai dengan target, yang mengindikasikan bahwa telah didapatkan konstruk pPiczA α -PrM/E-DENV1. Ke-12 koloni yang hasil elektroforesis menunjukkan adanya 2 band, yaitu sekitar 2000bp dan 2600bp. Koloni nomor 10 dan 11, tidak menunjukkan hasil yang tepat. Sedangkan hasil elektroforesis 10 koloni transforman hasil transformasi 1:5 menunjukkan hasil yang tepat, yaitu adanya 2 band pada 2000bp dan 2600bp.

G. Pengecekan hasil rekombinan dengan menggunakan primer AOX

Untuk mengkonfirmasi hasil pembuatan konstruk pPiczA α -PrM/E-DENV1 dilakukan pula dengan metode amplifikasi PCR dengan menggunakan primer AOX.

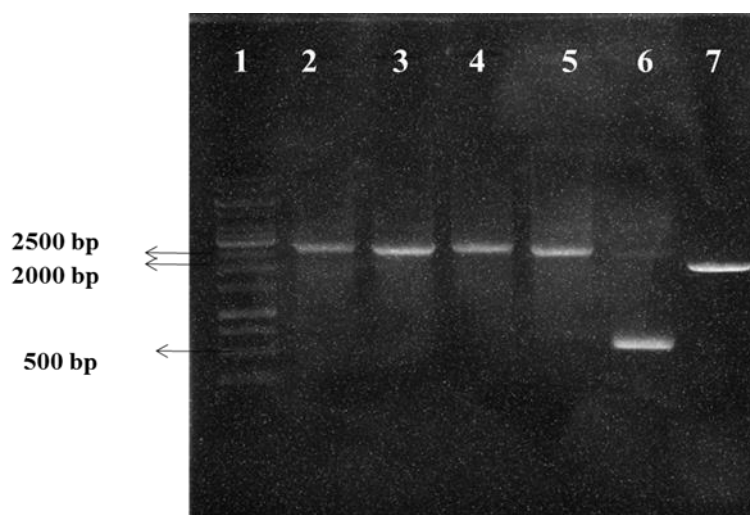
Persiapan peracikan reaksi PCR adalah sebagai berikut:

a. DNA (transformasi dengan perbandingan 1:3, nomor koloni 1)	:5 ul
Primer AOX reverse	:1 ul
Primer AOX forward	:1 ul
2x Master mix	:12,5 ul
ddH ₂ O	:5,5 ul
Total	:25 ul
b. DNA (transformasi dengan perbandingan 1:5, nomor koloni 1)	:5 ul
Primer AOX reverse	:1 ul
Primer AOX forward	:1 ul
2x Master mix	:12,5 ul
ddH ₂ O	:5,5 ul
Total	:25 ul

- Program PCR yang akan digunakan adalah:

Initial denaturasi	:94 ⁰ C 2 menit	
Denaturasi	:94 ⁰ C 1 menit	
Extention	:55 ⁰ C 1 menit	} 40 siklus
Final extention	:72 ⁰ C 3 menit	

Hasil elektroforesis dengan menggunakan agarose 0,8% ditunjukkan oleh gambar 73.

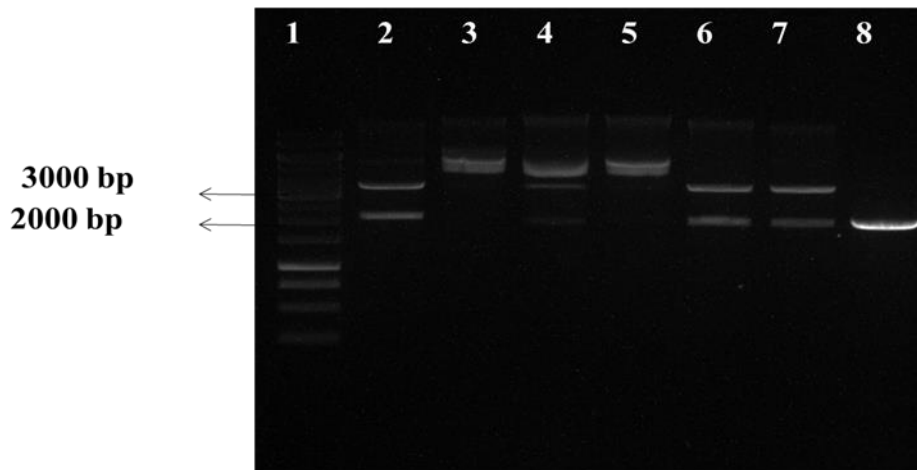


Gambar 73 Elektroforesis produk PCR dengan menggunakan primer AOX. Lajur 1: Marker 1 kb; Lajur 2: Hasil PCR transformasi 1:3 koloni 1 dengan primer AOX tanggal 16-11-2016; Lajur 3: Hasil PCR transformasi 1:5 koloni 1 dengan primer AOX tanggal 16-11-2016; Lajur 4: Hasil PCR transformasi 1:3 koloni 1 dengan primer AOX tanggal 18-11-2016; Lajur 5: Hasil PCR transformasi 1:3 koloni 1 dengan primer AOX tanggal 18-11-2016 ; Lajur 6: Hasil PCR pPicZα dengan primer AOX tanggal 18-11-2016 sebagai control; Lajur 7: Hasil PCR prM/E sebagai kontrol

Gambar 73 menunjukkan bahwa konstruk pPicZα-PrM/E-DENV1 telah didapatkan sesuai dengan tujuan, meskipun urutan basa dari gen PrM/E DENV1 belum diketahui kebenarannya.

H. Konfirmasi hasil rekombinan dengan menggunakan enzim restriksi yang ada didalam insert dan didalam plasmid pPicZα: *SacI* dan *HindIII*

Langkah lanjut dari penelitian adalah kembali mengkonfirmasi kebenaran konstruk pPicZα-PrM/E-DENV1 dengan cara memotong dengan enzim yang ada didalam gem target dan di dalam plasmid pPicZα: *SacI* dan *HindIII*. Hasil elektroforesis dengan menggunakan gel agarose 0,8% ditunjukkan pada gambar 74.



Gambar 74 Elektroforesis hasil pemotongan dengan enzim *SacI* dan *HindIII*. Lajur 1: Marker 1 kb; Lajur 2: Pemotongan hasil Transformasi 1:3 koloni 1 dengan *HindIII*; Lajur 3: Pemotongan hasil Transformasi 1:3 koloni 1 dengan *SacI*; Lajur 4: Pemotongan hasil Transformasi 1:5 koloni 1 dengan *HindIII*; Lajur 5: Pemotongan hasil Transformasi 1:5 koloni 1 dengan *SacI*; Lajur 6: Recombinan hasil Transformasi 1:5 koloni 1 (*XhoI* dan *NotI*); Lajur 7: Recombinan hasil transformasi 1:3 koloni 1 (*XhoI* dan *NotI*); Lajur 8: Hasil PCR prM/E DENV1

Gambar 74 menunjukkan bahwa konstruk pPiczA α -PrM/E-DENV1 dapat dikonformasi dengan pemotongan menggunakan enzim *HindIII*. Ekspektasi hasil pemotongan dengan enzim *HindIII* adalah 1979 bp dan 3539 bp. Sementara itu enzim *SacI* tidak dapat mengkonfirmasi kebenaran konstruk pPiczA α -PrM/E-DENV1. Ekspektasi hasil pemotongan dengan *Sac I* adalah 2029bp dan 3489 bp. Data di atas menunjukkan bahwa pemotong dengan *SacI* tidak menghasilkan 2 segmen DNA.

I. Konfirmasi hasil rekombinan dengan Sequencing DNA.

Konfirmasi lanjut keberhasilan penyusunan konstruk pPiczA α -PrM/E-DENV1 pada *E.coli* TOP 10 telah dilakukan dengan sequencing DNA. Hasil yang didapatkan tidak memuaskan, sehingga perlu dilakukan pengulangan sequencing DNA

5.5 PENELITIAN DI FK UNIVERSITAS INDONESIA

Konstruksi plasmid rekombinan prM/E virus dengue serotipe 2 strain Indonesia (pPICZαA/prM/E)

Ekstraksi RNA DENV-2

Proses ekstraksi RNA dengan menggunakan QIAamp Viral RNA Kit (QIAGEN). Selanjutnya dilakukan sintesis cDNA dilakukan dengan tekni RT-PCR menggunakan RNA hasil ekstraksi pada tahap sebelumnya. Proses pembuatan RNA dilakukan dengan 2 reaksi, yaitu reaksi 1 yang terdiri atas campuran random primer, dNTPs, RNase inhibitor, dan sampel RNA, sedangkan reaksi 2 terdiri atas 1x Buffer FS, DTT, RNase inhibitor, enzim SSRT. Proses RT-PCR dilakukan dengan suhu denaturasi 65 °C selama 5 menit, annealing suhu 25 °C selama 5 menit, polimerisasi 50 °C selama 1 jam, dan reaksi distop pada suhu 70 °C selama 15 menit. Reaksi 2 dimasukkan sebelum memasuki polimerisasi dengan cara menghentikan sebentar proses RT-PCR (*pause*). Setelah proses pembuatan cDNA selesai, cDNA yang diperoleh dianalisa hasilnya dengan melakukan amplifikasi menggunakan primer LanD1 dan LanD2 dengan siklus sebagai berikut : pre-denaturasi 95 °C selama 5 menit, denaturasi 95 °C selama 45 menit, annealing 54 °C selama 30 menit, polimerisasi 72 °C selama 1 menit 15 detik, dan polimerisasi lanjutan 72 °C selama 7 menit.

Konstruksi gen prM/E virus dengue serotipe 2 strain Indonesia nomor isolat 151

a.1. Identifikasi isolat lokal Indonesia virus dengue serotipe 2

Sintesis cDNA pada virus dengue serotipe 2 dengan menggunakan kit Superscript ® III First-Strand Synthesis System for RT-PCR cat no. 18080-051 lot no. 1526597. Dalam tube dicampurkan RNA total sebanyak 6 uL, 50ng/uL Random Hexamers 1uL, 10mM DNTP mix 1uL, DEPC water 2uL. Campuran tersebut selanjutnya disebut mix 1. Mix 1 diinkubasi 65°C selama 5 menit, kemudian ditempatkan di es selama 1 menit. Tambahkan mix 2 yakni campuran 10X RT Buffer 2uL, 25 mM MgCl₂ 4uL, 0.1 DTT 2uL, 40 u/uL RNase Out 1uL, 200 u/uL Superscript RT 1uL. Campuran mix 1 dan mix 2 kemudian diinkubasi pada 25°C selama 10 menit. Dilanjutkan dengan inkubasi pada 50°C selama 50 menit, kemudian diinkubasi pada 85°C selama 5 menit. Setelah itu ditambahkan RNaseH 1 uL. Dilanjutkan dengan diinkubasi pada 37°C selama 20 menit. Kemudian cDNA digunakan sebagai template amplifikasi DNA atau disimpan pada freezer -20°C.

a.2. Desain primer

Desain primer dilakukan untuk memperoleh konstruksi gen prM/E dengue virus serotipe 2. Desain primer dilakukan dengan menggunakan *software snapgene*. Primer yang

digunakan adalah primer dengan modifikasi penambahan stop kodon untuk menghindari residu asam amino lain yaitu *histidine* dan epitop c-myc. Berikut merupakan urutan basa primer yang digunakan.

Tabel 11 Desain Primer konstruksi gen prM/E dengue virus serotipe 2 dengan modifikasi stop kodon

	Urutan Basa Primer dengan Stop Kodon
Forward	5'-TAATCTCGAGAAAAGATTCCATTTAACCACACGCAAT-3'
Reverse	5'-TAATTCTAGACTAAGCCTGCACCATAACTCCCCAAA-3'

a.3. Penyiapan gen prM/E dengue virus serotipe 2

Amplifikasi gen prM/E DENV-2 dengan teknik PCR menggunakan pasangan primer yaitu pasangan primer *forward* dan *reverse* spesifik untuk cloning sesuai tabel diatas. Kedua primer di desain memiliki situs restriksi yakni enzim **XhoI** primer *forward* dan enzim **XbaI** pada primer *reverse*. Protokol PCR sesuai protokol hasil optimasi dengan menggunakan Enzim Taq DNA Polymerase . Campuran reaksi yang digunakan adalah 10X Reaction Buffer tanpa Mg²⁺ 5 uL, DNTP 1 uL, MgCl₂ 1,5 uL, Platinum Taq DNA Polymerase 1 uL, primer forward 1 uL, primer reverse 1 uL, dan cetakan cDNA dengan konsentrasi maksimal sebanyak 400 ng/uL. Siklus suhu yang digunakan adalah denaturasi awal 94°C selama 2 menit, denaturasi pada 94°C selama 1 menit, annealing pada 60°C selama 1 menit, ekstensi 72 °C selama 4 menit dengan pengulangan sebanyak 40 siklus. Amplifikasi dilakukan pada mesin Thermal Cycler (Biorad C1000).

Produk PCR prM/E yang dihasilkan dianalisis menggunakan elektroforesis jel agarose 1% dengan etidium bromide (EtBr). Jel agarose dibuat dengan cara melarutkan 1 gr bubuk agarose (Top Vision Agarose cat no. R.0491 lot no. 00128045) dalam 100 ml dalam TAE Buffer 1x (Invitrogen Ref. 15558041 lot no. 1309095) ditambahkan 10 uL ethidium bromide (Biorad ct. no. C-9009 lot no. 1502F). Larutan dibekukan dalam cetakan yang memiliki sisir. Elektroforesis dilakukan dalam tangki khusus elektroforesis merk Biorad, DNA yang akan dianalisis di campur dengan 6x *loading buffer* dengan perbandingan masing-masingnya 4:1 selanjutnya dimasukkan ke dalam setiap sumur pada jel agarosa. Selain produk PCR, pada proses elektroforesis juga diikutkan marker DNA 1 kb plus Fermentas untuk menentukan besarnya pita DNA hasil elektroforesis. Elektroforesis dilakukan pada tegangan listrik 100 volt selama 30 menit. Jel hasil elektroforesis selanjutnya diviisualisasikan dan dianalisis

DNA prM/E dilakukan di *GelDoc Transilluminator* (BIORAD) dan akan menghasilkan pita yang berukuran sekitar 1.983 bp.

Purifikasi hasil konstruksi gen prM/E dengan menggunakan kit *Promega Wizard SV Gen and PCR Clean Up System* (cat No. A9281 lot no. 0000160057). Ditimbang microcentrifuge tube 1.5 mL (a gram). Potong jel hasil elektroforesis PCR prM/E, dan transfer kedalam microcentrifuge tube yang telah ditimbang, kemudian timbang tube beserta isi jel (b gram). Dihitung berat jel ($c = b - a$). Ditambahkan membran binding solution 10 uL setiap 10 mg berat jel. Inkubasi pada 60°C selama 10 menit hingga jel larut, vortex setiap 5 menit. SV mini column ditempatkan pada collection tube, transfer campuran kedalam minicolumn diinkubasi selama 1 menit RT. Sentrifugasi kolom pada 16.000 g (14.000 rpm) selama 1 menit. Filtrat dibuang dan ditambahkan membran wash solution sebanyak 700 uL kedalam kolom. Sentrifugasi kolom pada 16.000 g (14.000 rpm) selama 1 menit. Filtrat dibuang dan ditambahkan membran wash solution sebanyak 500 uL kedalam kolom. Sentrifugasi kolom pada 16.000 g (14.000 rpm) selama 5 menit. Filtrat dibuang, kemudian disentrifugasi kolom kosong pada 16.000 g (14.000 rpm) selama 1 menit. Kolom kemudian dipindahkan pada microcentrifuge tube 1.5 mL steril. Kemudian ditambahkan 50 uL nuclease free water pada kolom. Inkubasi selama 1 menit RT. Sentrifugasi kolom pada 16.000 g (14.000 rpm) selama 1 menit. DNA hasil purifikasi disimpan pada 4°C atau -20°C untuk penyimpanan lebih lama. Konsentrasi dihitung menggunakan alat NanoView.

a. Penyiapan Vektor Plasmid pPICZαA

b.1. Penyiapan sel kompeten bakteri *E.coli* TOP 10F.

Bakteri kompeten *E.coli* galur TOP10F dipersiapkan untuk transformasi plasmid pPICZαA. Bakteri ditumbuhkan pada media Luria Bertani (LB) agar low salt dan diinkubasi pada 37°C selama 16 jam. Campuran LB agar *low salt* adalah 10 g Tryptone (Sigma-Aldrich, cat no. CR014-500G lot no. 0000154901), 5 g NaCl (Sigma-Aldrich, lot no. K30322804), dan 5 g Ekstrak Yeast (Oxoid, lot no. 416451) ke dalam 950 ml air distiled. Larutan dibuat pada pH 7.5 dengan penambahan NaOH (Merck, lot. B929695). Untuk media agar, tambahkan 15g/L agar (Sigma-Aldrich, cat no. 214010 lot no. 5146181) sebelum proses autoklaf. Setelah inkubasi, disubkultur kembali pada media LB cair dilanjutkan dengan inkubasi *rotary shaker* pada 37 °C dengan kecepatan 150 rpm selama 16 jam. Setelah diinkubasi, dilakukan subkultur pada media LB low salt cair baru dengan absorbansi awal sebesar 0,1 pada $\lambda = 600$ nm. Kemudian diinkubasi kembali dengan *rotary shaker* pada suhu 37 °C dengan kecepatan 200 rpm, diukur absorbansinya setiap jam sampai OD₆₀₀ adalah 0,5-

0,7. Pertumbuhan bakteri dihambat dengan menginkubasi kultur di dalam es selama 20 menit, kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 5.000 rpm selama 15 menit pada suhu 4 °C. Supernatan dibuang, kemudian pellet ditambah 25 ml gliserol dingin 10% setelah itu disentrifugasi kembali dengan kecepatan 5.000 rpm selama 15 menit pada suhu 4°C. Supernatan dibuang, kemudian pellet ditambah 12,5 ml gliserol dingin 10% dan disentrifugasi 5.000 rpm selama 15 menit pada suhu 4 °C. Supernatan dibuang, kemudian ditambahkan 1 ml gliserol dingin 10% dan disentrifugasi dengan kecepatan 13.000 rpm selama 15 menit pada suhu 4 °C. Supernatan dibuang kembali, kemudian ditambahkan 0,1 ml gliserol dingin 10% sampai diperoleh hasil sel kompeten $1-3 \times 10^{10}$ cells/ml. Sel elektrokompeten disimpan pada suhu -80 °C sampai digunakan elektroporasi. Transformasi plasmid pPICZαA pada sel kompeten *E.coli TOP 10F* dengan menggunakan alat elektroforator Biorad.

b.2. Isolasi plasmid pPICZαA hasil transformasi

Sel *E.coli* TOP 10 hasil transformasi yang mengandung plasmid pPICZαA ditumbuhkan pada media LB agar + Zeocin 25 µg/ml. Satu koloni *E.coli* TOP 10 hasil transformasi yang tumbuh ditanam pada media LB cair + Zeocin 25 µg/ml dan diinkubasi menggunakan *rotary shaker* pada suhu 37 °C selama 16 jam dengan kecepatan 150 rpm. Kemudian plasmid pPICZαA diisolasi menggunakan kit Wizard SV Minipreps DNA Purification Sytem (Promega). Prosedur kerja dilakukan sesuai protokol pada kit. 10 mL sel kultur disentrifugasi 4000 rpm selama 12 menit. Supernatan dibuang, sel pelet ditambahkan 250 µl larutan CRA, kemudian dihomogenisasi dengan pipet. Campuran ditambahkan 250 µl larutan lisis sel (CLS), dicampur dengan cara membolak-balikkan 4 kali. Kemudian ditambahkan 10 µl larutan *alkaline protease*, bolak-balik kembali 4 kali, dan diinkubasi pada suhu ruang selama 5 menit. Selanjutnya ditambahkan 350 µl larutan netralisasi (NSB), bolak-balik 4 kali kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 14.000 rpm selama 10 menit. Supernatan dipindahkan ke tabung isolasi kemudian disentrifugasi lagi dengan kecepatan 14.000 rpm selama 1 menit. Selanjutnya dilakukan pencucian dengan menambahkan 750 µl larutan pencuci, disentrifugasi dengan kecepatan 14.000 rpm selama 1 menit, ditambahkan lagi 250 µl larutan pencuci, disentrifugasi 14.000 rpm selama 2 menit. Kolom kemudian dipindahkan pada microcentrifuge tube steril. Selanjutnya ditambahkan 50 µl *nuclease free water*, kemudian disentrifugasi 14.000 rpm selama 1 menit dan disimpan pada suhu -20°C sampai akan digunakan. Konsentrasi DNA dihitung menggunakan alat NanoView.

b. Pengklonan gen prM/E ke dalam plasmid pPICZαA

c.1. Pemotongan gen prM/E dengue virus serotipe 2 dan plasmid pPICZαA untuk kloning

Gen sisipan prM/E DENV-2 dan plasmid pPICZαA yang telah disiapkan sebelumnya dipotong menggunakan 2 buah enzim restriksi yang ditambahkan pada primer pengamplifikasi gen sisipan. Enzim tersebut adalah enzim *XhoI* dan *XbaI*. Prosedur kerja dilakukan sesuai protokol enzim restriksi pada kit yang telah dioptimasi. Hasil optimasi menunjukkan bahwa setiap konsentrasi DNA 1000 ng/uL diperlukan enzim sebanyak 10 unit. Untuk pemilihan buffer *double digest* digunakan buffer Tango yang merupakan buffer terbaik untuk *double digest* enzim *XhoI* dan *XbaI*. Pemotongan dilakukan dengan campuran reaksi berupa DNA (masing-masing gen sisipan prM/E atau vektor pPICZαA) ditambahkan dengan enzim restriksi, 2X buffer Tango dan *Deionise Water* hingga volume akhir 100 ul. Campuran kemudian diinkubasi pada suhu 37 °C selama 16 jam dan reaksi dihentikan melalui pemanasan pada suhu 65 °C selama 10 menit.

Verifikasi hasil pemotongan dengan enzim restriksi pada prM/E dan plasmid pPICZαA, diidentifikasi dengan proses elektroforesis pada gel agarose 1% dan divisualisasi dengan Etidium Bromide untuk memastikan pemotongan berjalan sempurna. Hasil pemotongan sempurna diperlihatkan dengan pita DNA yang dihasilnya hanya 1 pita, artinya DNA berbentuk linier.

c.2. Purifikasi hasil pemotongan gen prM/E dengue virus serotipe 2 dan plasmid pPICZαA untuk kloning

Gen prM/E dan plasmid pPICZαA yang telah direstriksi, masing-masing dilakukan purifikasi menggunakan Wizard SV Gel and PCR Clean-up system kit (Promega, cat No. A9281 lot no. 0000160057). Prosedur kerja sesuai dengan protokol pada kit. Larutan hasil reaksi pemotongan enzim pada gen sisipan prM/E dan plasmid pPICZαA masing-masing ditambahkan larutan *membran binding* dengan volume yang sama. Kemudian diinkubasi pada suhu ruang selama 1 menit. Larutan dipindahkan ke tabung purifikasi, kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 14.000 rpm selama 1 menit kemudian dilanjutkan dengan proses pencucian dengan menambahkan 700 µl larutan pencuci. Kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 14.000 rpm selama 1 menit, ditambahkan kembali 500 µl larutan pencuci, disentrifugasi kembali dengan kecepatan 14.000 rpm selama 5 menit, disentrifugasi lagi dengan kecepatan 14.000 rpm selama 1 menit, kemudian ditambahkan 35 µl *nuclease free water*. Selanjutnya diinkubasi pada suhu ruang selama 1 menit, kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 14.000 rpm selama 1 menit, dan dipindahkan ke tabung sentrifugasi untuk

disimpan pada suhu -20°C sampai akan digunakan. Konsentrasi DNA dihitung menggunakan alat NanoView.

c.3. Ligasi gen prM/E virus dengue serptipe 2 dengan plasmid pPICZαA

Gen prM/E disisipkan ke vektor pPICZαA dengan cara reaksi ligasi menggunakan enzim T4 DNA *ligase* (Thermo Scientific). Prosedur ligasi plasmid pPICZαA dengan gen sisipan prM/E dengan modifikasi stop kodon dilakukan sebagai berikut: perbandingan gen prM/E dengan plasmid pPICZαA adalah 8:1. Dalam kit disebutkan bahwa diperlukan 5 unit enzim untuk ligase DNA 20 ng/uL. Reaksi dilakukan dengan campuran 10x buffer T4 DNA ligase 10 uL, 50 uL enzim T4 DNA ligase, DNA sisipan prM/E sebanyak 11,43 uL (1000 ng), DNA vektor pPICZαA sebanyak 2,28 uL (125 ng) dan DW sampai volume total 100 µl. Prosedur ligasi plasmid pPICZαA tanpa gen sisipan prM/E (control negatif) dilakukan sebagai berikut: perbandingan water dengan plasmid pPICZαA adalah 8:1. Reaksi dilakukan dengan campuran 10x buffer T4 DNA ligase 6.6 uL, 50 uL enzim T4 DNA ligase, water kontrol sebanyak 11,43 uL, DNA vektor pPICZαA sebanyak 2,28 uL (125 ng) dan DW sampai volume total 100 µl. Sebelum dilakukan reaksi ligasi, campuran diinkubasi terlebih dahulu pada suhu 55° C selama 3 menit, kemudian reaksi ligasi diinkubasi pada suhu 22°C selama 2 jam dilanjutkan dengan inaktif pada suhu 65°C selama 10 menit. Ligasi berjalan melalui penyisipan gen prM/E ke *multiple cloning site* plasmid di antara situs restriksi.

c.4. Purifikasi hasil ligasi gen prM/E dengue virus serotipe 2 dan plasmid pPICZαA

Gen prM/E dan plasmid pPICZαA serta control negatif yang telah diligasi, masing-masing dilakukan purifikasi menggunakan Wizard SV Gel and PCR Clean-up system kit (Promega, cat No. A9281 lot no. 0000160057). Prosedur kerja sesuai dengan protokol pada kit. Larutan hasil reaksi ligasi masing-masing ditambahkan larutan *membran binding* dengan volume yang sama. Kemudian diinkubasi pada suhu ruang selama 1 menit. Larutan dipindahkan ke tabung purifikasi, kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 14.000 rpm selama 1 menit kemudian dilanjutkan dengan proses pencucian dengan menambahkan 700 µl larutan pencuci. Kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 14.000 rpm selama 1 menit, ditambahkan kembali 500 µl larutan pencuci, disentrifugasi kembali dengan kecepatan 14.000 rpm selama 5 menit, disentrifugasi lagi dengan kecepatan 14.000 rpm selama 1 menit, kemudian ditambahkan 35 µl *nuclease free water*. Selanjutnya diinkubasi pada suhu ruang selama 1 menit, kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 14.000 rpm selama 1 menit, dan dipindahkan ke tabung sentrifugasi untuk disimpan pada suhu -20°C sampai akan digunakan. Konsentrasi DNA dihitung menggunakan alat NanoView.

c.5. Transformasi hasil ligasi

Hasil ligasi ditransformasikan ke dalam *E. coli* strain *TOP10F* kompeten untuk pembuatan plasmid rekombinan. Prosedur transformasi dilakukan dengan metode electric shock menggunakan electroporator (Bio-Rad GenePulser). *Thawing* sel dan sampel, kemudian disiapkan microcentrifuge tube 1.5 mL dan kuvet elektroforator 0.2 cm yang disimpan pada es. Dicampurkan 20uL sel kompeten *E. coli* dan 10uL hasil purifikasi ligasi (konsentrasi DNA $\pm 1\mu\text{g}$) pada kuvet dingin. Campuran diinkubasi pada es selama 1 menit. Pada tampilan awal alat electroporator, buka *Pre-set Protocols screen*, kemudian *Bacterial Protocol screen* (tekan 4, kemudian enter dua kali). Ketika menggunakan kuvet 0,2 cm tekan 2 kemudian enter untuk memilih *Protokol Detail screens E. coli* dan melakukan transformasi pada 2.5 kV. Campuran dibiarkan berada pada dasar kuvet, kemudian tempatkan kuvet pada *ShockPod* kemudian tekan pulse. Pulse parameter kemudian dicatat. Kuvet kemudian segera diambil dan segera diberikan 1mL medium LB Broth *low salt*, dan diresuspen dengan menggunakan pipet. Transfer campuran pada tube, dan diinkubasi selama 1 jam pada 37°C dengan shaker 225 rpm. Hasil elektroforasi kemudian disentrifuge selama 4 menit 1500 rpm. Bagian supernatan paling atas dibuang ($\pm 800\text{ uL}$) kemudian sisa pada tabung di resuspen dan ditanam pada media LB *agar* yang telah ditambahkan Zeocin 25 $\mu\text{g/ml}$ untuk seleksi.

c. Verifikasi plasmid rekombinan prM/E virus dengue serotipe 2

d.1. Isolasi Plasmid Rekombinan (koloni grouping)

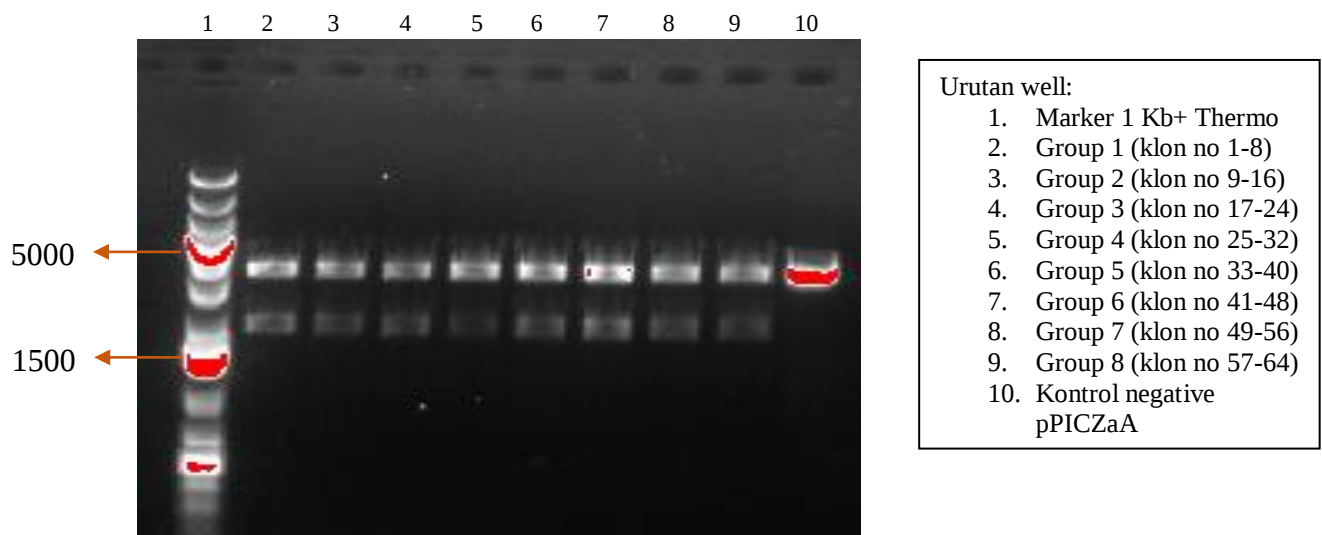
Koloni bakteri yang tumbuh pada medium LB *agar* yang telah ditambahkan Zeocin 25 $\mu\text{g/ml}$ kemudian dihitung untuk mengetahui efisiensinya. Koloni plasmid rekombinan yang tumbuh kemudian ditanam pada media cair LB yang telah ditambahkan Zeocin 25 $\mu\text{g/ml}$, teknik yang dilakukan untuk menghemat penggunaan medium, dilakukan kultur grouping. Setiap grup terdiri dari 5 nomor koloni yang berbeda. Kemudian kultur diinkubasi dengan *rotary shaker* pada suhu 37 °C selama 16 jam dengan kecepatan 150 rpm.

Kemudian hasil kultur diisolasi menggunakan protokol isolasi plasmid (Wizard Plus SV Minipreps DNA purification system). Prosedur kerja dilakukan sesuai protokol pada kit. 10 mL sel kultur disentrifugasi 4000 rpm selama 12 menit. Supernatan dibuang, sel pelet ditambahkan 250 μl larutan CRA, kemudian dihomogenisasi dengan pipet. Campuran ditambahkan 250 μl larutan lisis sel (CLS), dicampur dengan cara membolak-balikkan 4 kali. Kemudian ditambahkan 10 μl larutan alkaline protease, bolak-balik kembali 4 kali, dan diinkubasi pada suhu ruang selama 5 menit. Selanjutnya ditambahkan 350 μl larutan netralisasi (NSB), bolak-balik 4 kali kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 14.000 rpm

selama 10 menit. Supernatan dipindahkan ke tabung isolasi kemudian disentrifugasi lagi dengan kecepatan 14.000 rpm selama 1 menit. Selanjutnya dilakukan pencucian dengan menambahkan 750 μ l larutan pencuci, disentrifugasi dengan kecepatan 14.000 rpm selama 1 menit, ditambahkan lagi 250 μ l larutan pencuci, disentrifugasi 14.000 rpm selama 2 menit. Kolom kemudian dipindahkan pada microcentrifuge tube steril. Selanjutnya ditambahkan 50 μ l *nuclease free water*, kemudian disentrifugasi 14.000 rpm selama 1 menit dan disimpan pada suhu -20°C sampai akan digunakan.

d.2. Verifikasi klon pembawa plasmid rekombinan dengan metode pemotongan enzim restriksi XhoI dan XbaI.

Konfirmasi pertama dilakukan dengan pemotongan plasmid rekombinan menggunakan enzim restriksi XhoI dan XbaI. Hasil cloning gen prM/E merupakan fusi dengan plasmid pPICZ α A, sehingga apabila gen prM/E berhasil tersisip dengan orientasi yang benar akan dihasilkan 2 potongan pita DNA berukuran sekitar 3,6 kb dan 1.983 bp pada visualisasi gel agarose 1% dengan etidium bromide. Plasmid rekombinan hasil isolasi, setelah dihitung konsentrasi DNA menggunakan nanoview kemudian ditambahkan 2 μ l dari O reaksi, enzim restriksi XhoI dan XbaI (10U/ μ l) dan DW hingga volume akhir 20 μ l. Selain itu ditambahkan pula campuran pada plasmid pPICZ α A *kontrol negatif* sebagai kontrol. Campuran kemudian diinkubasi pada suhu 37 °C selama 3 jam dan reaksi dihentikan melalui pemanasan pada suhu 65 °C selama 10 menit. Hasil restriksi kemudian dianalisis dengan elektroforesis gel agarose 1%. Dilanjutkan dengan visualisasi *GelDoc*. Hasil dapat dilihat pada gambar di bawah ini.



Gambar 75 Hasil verifikasi plasmid rekombinan grouping dengan metode digesti XhoI dan XbaI

d.3. Isolasi Plasmid Rekombinan (koloni single)

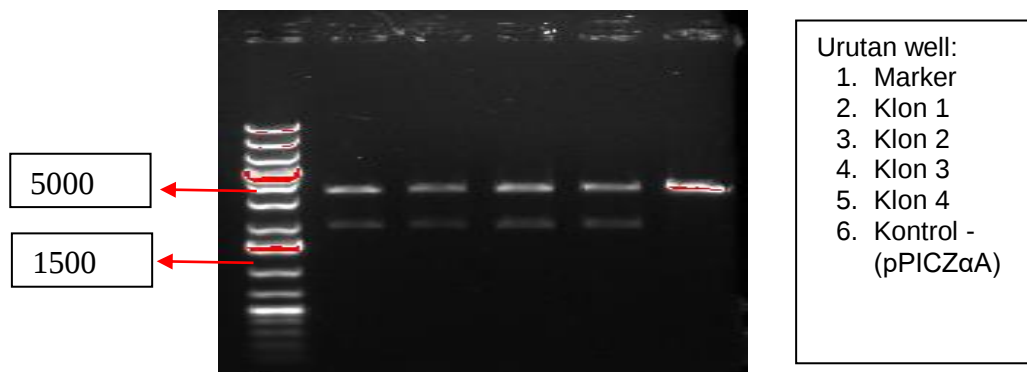
Dari hasil verifikasi pemotongan dengan enzim restriksi dapat diperoleh grup yang positif memiliki plasmid rekombinan. Kemudian dilakukan kultur satu koloni bakteri untuk nomor anggota grup pada medium LB *agar* yang telah ditambahkan Zeocin 25 µg/mL. Koloni plasmid rekombinan yang tumbuh kemudian ditanam pada media cair LB yang telah ditambahkan Zeocin 25 µg/ml. Kemudian kultur diinkubasi dengan *rotary shaker* pada suhu 37 °C selama 16 jam dengan kecepatan 150 rpm.

Kemudian hasil kultur diisolasi menggunakan protokol isolasi plasmid (*Wizard Plus SV Minipreps DNA purification system*). Prosedur kerja dilakukan sesuai protokol pada kit. 10 mL sel kultur disentrifugasi 4000 rpm selama 12 menit. Supernatan dibuang, sel pelet ditambahkan 250 µl larutan CRA, kemudian dihomogenisasi dengan pipet. Campuran ditambahkan 250 µl larutan lisis sel (CLS), dicampur dengan cara membolak-balikkan 4 kali. Kemudian ditambahkan 10 µl larutan alkaline protease, bolak-balik kembali 4 kali, dan diinkubasi pada suhu ruang selama 5 menit. Selanjutnya ditambahkan 350 µl larutan netralisasi (NSB), bolak-balik 4 kali kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 14.000 rpm selama 10 menit. Supernatan dipindahkan ke tabung isolasi kemudian disentrifugasi lagi dengan kecepatan 14.000 rpm selama 1 menit. Selanjutnya dilakukan pencucian dengan menambahkan 750 µl larutan pencuci, disentrifugasi dengan kecepatan 14.000 rpm selama 1 menit, ditambahkan lagi 250 µl larutan pencuci, disentrifugasi 14.000 rpm selama 2 menit. Kolom kemudian dipindahkan pada microcentrifuge tube steril. Selanjutnya ditambahkan 50 µl *nuclease free water*, kemudian disentrifugasi 14.000 rpm selama 1 menit dan disimpan pada suhu -20°C sampai akan digunakan.

d.4. Verifikasi klon pembawa plasmid rekombinan dengan metode pemotongan enzim restriksi XhoI dan XbaI.

Konfirmasi pertama dilakukan dengan pemotongan plasmid rekombinan menggunakan enzim restriksi XhoI dan XbaI. Hasil cloning gen prM/E merupakan fusi dengan plasmid pPICZαA, sehingga apabila gen prM/E berhasil tersisip dengan orientasi yang benar akan dihasilkan 2 potongan pita DNA berukuran sekitar 3,6 kb dan 1.983 bp pada visualisasi gel agarose 1% dengan etidium bromide. Plasmid rekombinan hasil isolasi dari kultur single koloni ditambahkan 2 µl dapar O reaksi, enzim restriksi XhoI dan XbaI (10U/µl) dan DW hingga volume akhir 20 µl. Selain itu ditambahkan pula campuran pada plasmid pPICZαA *control negatif* sebagai kontrol. Campuran kemudian diinkubasi pada suhu 37 °C selama 3 jam dan reaksi dihentikan melalui pemanasan pada suhu 65 °C selama 10 menit. Hasil

restriksi kemudian dianalisis dengan elektroforesis gel agarose 1%. Dilanjutkan dengan visualisasi *GelDoc*. Hasil dapat dilihat pada gambar di bawah ini.



Gambar 76 Hasil verifikasi plasmid rekombinan dengan metode digesti XhoI dan XbaI

d.5. Verifikasi klon pembawa plasmid rekombinan dengan metode PCR primer AOX dan primer spesifik prM/E.

Metode PCR plasmid rekombinan primer spesifik gen prM/E sesuai reaksi di atas, dan menggunakan primer plasmid pPICZαA untuk mengetahui kebenaran orientasi sisipan. Primer plasmid pPICZαA adalah sebagai berikut:

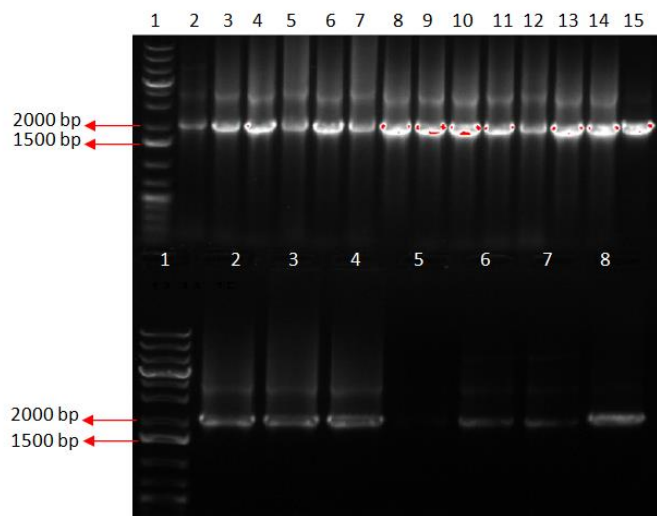
5'AOX1 : 5'GACTGGTTCCAATTGACAAGC 3'

3'AOX1 : 5'GCAAATGGCATTCTGACATCC 3'.

Apabila gen prM/E berhasil tersisip dengan orientasi yang benar menggunakan pasangan primer prM/E akan dihasilkan 1 potongan pita DNA berukuran sekitar 1983 kb, sedangkan dengan pasangan primer AOX akan dihasilkan 2 potongan pita DNA berukuran sekitar 2571 kb. Untuk kontrol negatif diperoleh ukuran pita pada 588 bp. Protokol PCR yang digunakan dengan primer AOX dan prM/E spesifik sesuai protokol hasil optimasi dengan menggunakan Enzim Taq DNA Polymerase. Campuran reaksi yang digunakan adalah Enzim Taq DNA Polymerase 1uL, 10X Reaction Buffer tanpa Mg^{2+} 5 uL, DNTP 1 uL, $MgCl_2$ 1,5 uL, 10 primer forward 1 uL, primer reverse 1 uL, dan cetakan cDNA dengan konsentrasi maksimal sebanyak 400 ng/uL. Siklus suhu yang digunakan dengan primer AOX adalah denaturasi awal 94°C selama 2 menit, denaturasi pada 94°C selama 1 menit, annealing pada 55°C selama 1 menit, ekstensi 72 °C selama 2,5 menit dengan pengulangan sebanyak 25 siklus. Sedangkan protokol yang digunakan dengan primer spesifik prM/E menggunakan adalah Enzim Taq DNA Polymerase 1uL, 10X Reaction Buffer tanpa Mg^{2+} 5 uL, DNTP 1

uL, MgCl₂ 1,5 uL, 10 primer forward 1 uL, primer reverse 1 uL, dan cetakan cDNA dengan konsentrasi maksimal sebanyak 400 ng/uL. Siklus suhu yang digunakan adalah denaturasi awal 94°C selama 2 menit, denaturasi pada 94°C selama 1 menit, annealing pada 60°C selama 1 menit, ekstensi 72 °C selama 4 menit dengan pengulangan sebanyak 40 siklus Amplifikasi dilakukan pada mesin Thermal Cycler (Biorad C1000).

Hasil PCR kemudian dianalisis dengan elektroforesis gel agarose 1% dilanjutkan dengan visualisasi menggunakan GelDoc. Hasil dapat dilihat pada gambar berikut.



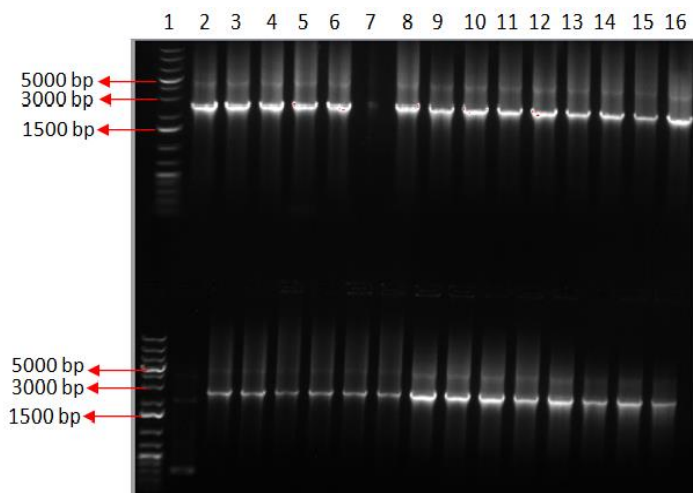
a

Urutan well atas:

1. Marker
2. Klon 1
3. Klon 2
4. Klon 3
5. Klon 4
6. Klon 5
7. Klon 6
8. Klon 9
9. Klon 10
10. Klon 12
11. Klon 13
12. Klon 14
13. Klon 15
14. Klon 16
15. Kontrol + (purify prM/E DENV-2)

Urutan well bawah:

1. Marker
2. Klon 49
3. Klon 50
4. Klon 51
5. -
6. Klon 63
7. Klon 64
8. Kontrol + (purify prM/E DENV-2)



b

Urutan well atas:

1. Marker
2. Klon 1
3. Klon 2
4. Klon 3
5. Klon 4
6. Klon 5
7. -
8. Klon 7
9. Klon 8
10. Klon 9
11. Klon 10
12. Klon 12
13. Klon 13
14. Klon 14
15. Klon 15
16. Klon 15

Urutan well bawah:

1. Marker
2. Kontrol negative pPICZaA
3. Klon 16
4. Klon 49
5. Klon 50
6. Klon 51
7. Klon 52
8. Klon 53
9. Klon 54
10. Klon 55
11. Klon 56
12. Klon 58
13. Klon 59
14. Klon 62
15. Klon 63
16. Klon 64

Gambar 77 Hasil verifikasi plasmid rekombinan dengan metode PCR dengan primer spesifik prM/E (a) dan primer spesifik AOX (b)

d.6. Verifikasi klon pembawa plasmid rekombinan dengan metode sekuensing.

Nomor koloni yang terpilih dari verifikasi dengan metode enzim restriksi dan metode PCR primer spesifik AOX dan prM/E adalah koloni nomor 1. Kemudian koloni ini diverifikasi kembali urutan basanya dengan metode sekuensing. Hal ini dilakukan untuk melihat orientasi sama dengan referensi sekuens. Hasil sekuensing dapat dilihat di bawah ini.

Urutan basa untuk koloni 1 hasil sekuensing.

```
ATGAGATTTCTTCAATTTTTACTGCTGTTTTATTTCGCAGCATCCTCCGCATTAGC
TGCTCCAGTCAACACTACAACAGAAGATGAAACGGCACAAATTCGGCTGAAGC
TGTCATCGGTTACTCAGATTTAGAAGGGGATTTTCGATGTTGCTGTTTTGCCATTTT
CCAACAGCACAAATAACGGGTATTGTTTATAAATACTACTATTGCCAGCATTGC
TGCTAAAGAAGAAGGGGTATCTCTCGAGAAAAGATTCCATTTAACCACACGCAA
TGGAGAACCACACATGATCGTCAGTAGACAAGAAAAAGGGAAAAGTCTTCTGTT
TAAAACAGAAAACGGTGTGAACATGTGCACCCTCATGGCCATGGACCTTGGTGA
ACTGTGTGAAGACACAATCACTTATAATTGTCCTCTTCTCAGGCAGAATGAACCA
GAAGACATAGACTGTTGGTGCAACTCTACGTCTACATGGGTAACCTTATGGGACAT
GCACCGCCACAGGAGAACACAGAAGGGAAAAAAGATCAGTGGCACTCGTTCTGC
ATGTGGGAATGGGACTGGAGACACGAACATGAAACATGGATGTCATCAGAAGGG
GCCTGGAAACATGCGCAGAGAATTGAAACTTGGGTCTTGAGACATCCAGGCTTC
ACCATAATGGCAGCAATCCTGGCATAACCATAGGAACGACATATTTCCAAAGA
GTCCTGATTTTCATCTTACTGACAGCTGTGCTCCTTCAATGACAATGCGTTGCAT
AGGAATATCAAATAGAGACTTTGTGGAAGGGGTTTCAGGAGGAAGCTGGGTTGA
TATAGTCTTGGAACATGGAAGCTGTGTGACAACGATGGCGAAAAATAAACCAAC
ATTGGATTTTGAACATGATAAAAACAGAAGCCAAACATCCCGCCACTCTATTAGAC
CTGCCGTTACCATGGCTGCCCGGAGCAGACACACAAGGATCAAATTGGATACAG
AAGGAGACATTGGTCACTTTCAAAAATCCCCATGCAAAGAAACAGGATGTTGTT
GTTTTAGGATCCCAAGAAGGGGCTATGCACACAGCACTCACAGGGGCCACGGAA
ATCCAGATGTCATCAGGAAACTTACTGTTTACAGGACATCTTAAATGCAGGTTGA
GAATGGACAACTACAGCTCAAAGGAATGTCATATTCCATGTGTACAGGAAAGT
TCAAAGTTGTGAAGGAAATAGCAGAAACACAACATGGAACAATAGTTATCAGAG
TACAATATGAAGGGGACGGTTCTCCGTGCAAAATCCCTTTTGAAATAATGGATCT
GGAAAAAAGACATGTCTTAGGTCGCTTGATCACAGTCAACCCAATTGTCACAGA
AAAAGACAGCCCAGTCAACATAGAAGCAGAACCTCCATTCGGAGACAGCTACAT
CATTATAGGAGTAGAACCAGGACAACCTGAAGCTCAGCTGGTTTAAGAAAGGAAG
TTCTATTGGCCAAATGTTTGAGACAACAATGAGAGGAGCGAAGAGAATGGCCAT
TTTAGGTGACACAGCTTGGGATTTTGGATCCCTGGGAGGAGTGTTTACATCTATA
GGAAAGGCCCTCCACCAAGTCTTTGGAGCAATCTATGGGGCTGCCTTCAGTGGGG
TTTCATGGACTATGAAAATCCTCATAGGAGTTGTCATCACATGGATAGGAATGAA
TTCACGCAGCACCTCACTGTCTGTGTCACTAGTATTAGTGGGAATCGTGACATTG
TATTTGGGAGTTATGGTGCAGGCTTAGTCTAGAACAAAACTCATCTCAGAAGAG
GATCTGAATAGCGCCGTCGACCATCATCATCATCATTGAGTTTGTAGCCTTA
GACATGACTGTTCTCAGTTCAAG
```


Hasil urutan basa koloni 1 yang diperoleh kemudian dibandingkan dengan reference sequence dan diperoleh hasil kemiripan 99,87%. Terjadi mutasi pada basa nomor 545 muncul basa T yang seharusnya. Hasil menunjukkan sebagai berikut.

Selain dilihat urutan basa nya, verifikasi dilakukan dengan melihat urutan asam amino pada koloni 1. Hasil dapat dilihat di bawah ini.

```
MRFPSIFTAVLFAASSALAAPVNTTTEDETAQIPAEAVIGYSDLEGDFDVAVLPFNSNSTN
NGLLFINTTIASIAAKEEGVSLEKRFHLTTRNGEPHMIVSRQEKGKSLLFKTENGVMCT
LMAMD LGELCEDTITYNCPLLRQNEPEDIDCWCNSTSTWVTYGTCTATGEHRREKRSVAL
VLHVGMGLETRTETWMSSEGAWKHAQRIETWVLRHPGFTIMAAILAYTIGTTYFQRVLI F
ILLTAVAPSM TMRCIGISNRDFVEGVSGGSWVDIVLEHGSCVTTMAKNKPTLDFELIKTE
AKHPATLRKYCIEAKLTNTTTASRCPTQGEPSLNEEQDKRFVCKHSMVDRGWGNGCGLFG
KGGIVTCAMFTCKKNMEGKIVQPENLEYTIVITPHSGEENAVGNDTGKHGKEIKVTPQSS
ITEAELTGYGTVTMECSPRTGLDFNEMVLLQMENKAWLVHRQWFLDLPLPWLPGADTQGS
NWIQKETLVTFKNPHAKKQDVVVLGSQEGAMHTALTGATEIQMSSGNLLFTGHLKCRLRM
DKLQLKGMSYSMCTGKFKVVKEIAETQHGTIVIRVQYEGDGSPCKIPFEIMDLEKRHVLG
RLITVNP I VTEKDSPVNIEAEPFPGDSYIIIGVEPGQLKLSWFKKGSSIGQMFETTM RGA
KRMAILGDTAWDFGSLGGVFTSIGKALHQVF GAIYGAAFSGVSWTMKILIGVVITWIGMN
SRSTSLSVSLVLVGIVTLYLGVMVQA*LEQKLI SEEDLNSAVDHHHHHH*
```

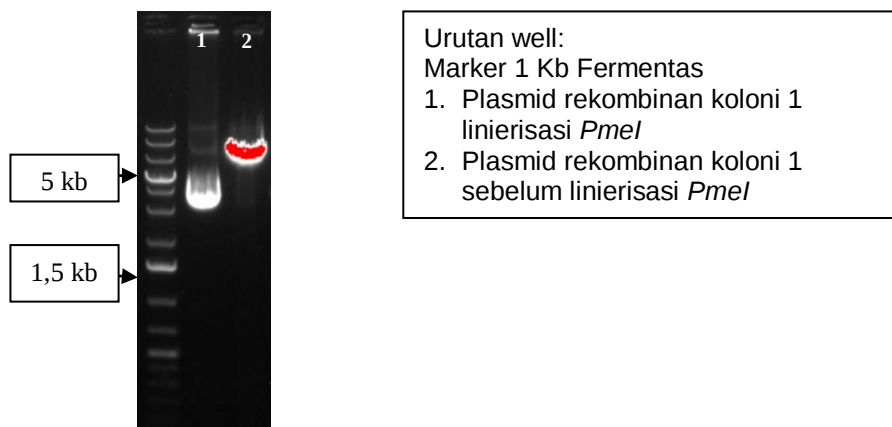
Hasil urutan asam amino kemudian dibandingkan dengan urutan asam amino referensi. Hasil diperoleh kesamaan urutan asam amino antara koloni 1 dengan referensi sebanyak 99,87%. Terdapat perubahan asam amino dari Prolin menjadi Leusin. Hasil dapat dilihat pada gambar berikut.

		10	20	30	
klon 151 d2 baru (5504 bp)		MRFPSITAVLFAASSALAAPVNTTTEDETAQIPAEAVI			
klon 1 AOX F					
		90	100	110	1
Reference Sequence	bp)	SLEKRFHLLTTRNGEPHMIIVSRQEKGSLLFKTENGVMNC			
Plasmid Rekombinan Koloni No. 1					
		170	180	190	2
Reference Sequence	bp)	TYGTCTATGEHRREKRSVALVPHVGMGLETRTETWMSSE			
Plasmid Rekombinan Koloni No. 1		L.....			
		250	260	270	2
Reference Sequence	bp)	ILLTAVAPSM TMRCIGISNRD FVEGVSGGSWVDIVLEHG			
Plasmid Rekombinan Koloni No. 1					
		330	340	350	3
Reference Sequence	bp)	TASRCPTQGEPSLNEEQDKRFVCKHSMVDRGWGNGCGLF			
Plasmid Rekombinan Koloni No. 1					
		410	420	430	4
Reference Sequence	bp)	AVGNDTGKHGKEIKVTPQSSITEAELTG YGTVTMECSPR			
Plasmid Rekombinan Koloni No. 1					
		490	500	510	5
Reference Sequence	bp)	NWIQKETLVT FKNPHAKKQDVVVLGSQEGAMHTALTGAT			
Plasmid Rekombinan Koloni No. 1					
		570	580	590	6
Reference Sequence	bp)	KEIAETQHGTIVIRVQYEGD GSPCKIPFEIMDLEKRHVL			
Plasmid Rekombinan Koloni No. 1					
		650	660	670	6
Reference Sequence	bp)	SWFKKGSSIGQMFE TTMRGAKRMAILGDTAWDFGSLGGV			
Plasmid Rekombinan Koloni No. 1					
		730	740	750	7
Reference Sequence	bp)	SRSTSLSVSLVLVGI VTLTYLGVMVQA*LEOKLISEEDLN			
Plasmid Rekombinan Koloni No. 1					

2. Ekspresi Protein Rekombinan pada *Pichia pastoris*

a. Linierisasi plasmid rekombinan

Plasmid rekombinan yang sudah dikonfirmasi keberadaan dan kebenaran orientasi insert yakni koloni 11 untuk plasmid rekombinan pPICZαA/prM/E, kemudian dilinearisasi dengan enzim *PmeI* untuk efisiensi proses transformasi. Pita yang diperoleh dari hasil linierisasi yakni untuk plasmid rekombinan ukurannya ± 5100 bp, dan kontrol negatif yang tidak mengandung insert prM/E adalah pada ukuran 3,6 kb. Campuran untuk reaksi linierisasi yang digunakan adalah 10x buffer 15 uL, enzim *PmeI* sebanyak 15 ul, 51 uL untuk DNA plasmid rekombinan, deionise water sampai volume 150 uL. Konsentrasi DNA yang dipakai adalah 14,8 ug/uL untuk plasmid rekombinan. Campuran reaksi kemudian diinkubasi pada suhu 55° C selama 5 menit untuk memaksimalkan proses linierisasi, kemudian diinkubasi pada suhu 37° C selama 16 jam, dan diinactive pada suhu 65° C selama 20 menit. Hasil linearisasi dianalisis dengan gel agarose 1% dan divisualisasi dengan Etidium Bromide. Kemudian dipurifikasi dengan protokol Wizard SV gel & PCR clean up system seperti yang dijelaskan di atas. Hasil purifikasi kemudian dihitung konsentrasinya menggunakan alat NanoView. Hasil linierisasi dapat dilihat pada gambar berikut ini.



Gambar 78 Hasil linierisasi plasmid rekombinan prM/E virus dengue serotipe 2

Plasmid rekombinan yang telah dilinerisasi kemudian dilakukan purifikasi dengan kit *Purelink® PCR Purification kit* (Invitrogen, cat No. K3100-01 lot no. 403023102). Prosedur kerja sesuai dengan protokol pada kit. Larutan hasil reaksi ligasi masing-masing ditambahkan 4 kali volume dengan larutan *binding* dengan isopropanol. Larutan dipindahkan ke tabung purifikasi, kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 14.000 rpm selama 1 menit kemudian dilanjutkan dengan proses pencucian dengan menambahkan 700 µl larutan pencuci.

Kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 11.000 g selama 1 menit, ditambahkan kembali 650 µl larutan pencuci, disentrifugasi kembali dengan kecepatan 11.000 g selama 1 menit, disentrifugasi lagi dengan kecepatan 12.000 g selama 3 menit, kemudian ditambahkan 20 µl *nuclease free water*. Selanjutnya diinkubasi pada suhu ruang selama 1 menit, kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 12.000 g selama 2 menit, dan dipindahkan ke tabung sentrifugasi untuk disimpan pada suhu -20°C sampai akan digunakan. Konsentrasi DNA dihitung menggunakan alat NanoView.

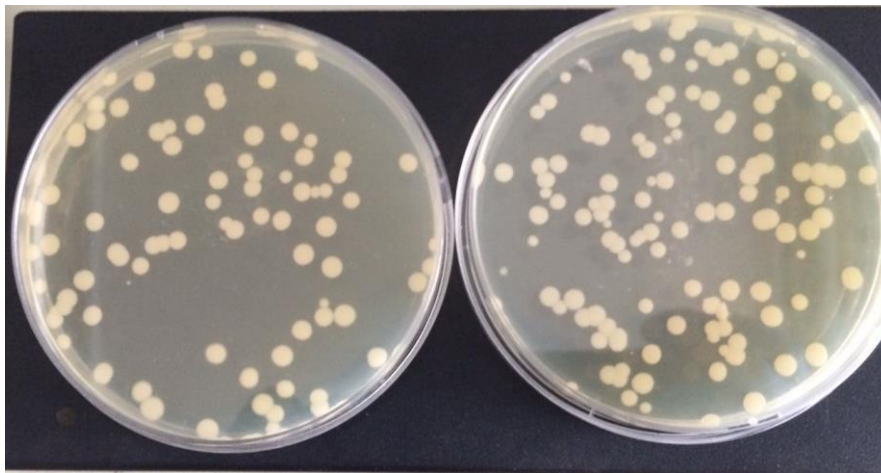
b. Penyiapan sel *Pichia Pastoris*

Inokulasi strain *Pichia pastoris* pada media agar YPD (Yeast Extract Peptone Dextrose Medium) dengan campuran 1% yeast extract (oxoid, 416451), 2% peptone (Himedia, cat. 91249-500 g lot no. BCBP8880), 2% dextrose (RM016-500 G lot no. 0000043079), 2% agar (214010, lot no. 5146181). Strain *Pichia pastoris* yang digunakan yaitu X33. Kemudian diinkubasi pada suhu 28 °C selama 2 hari. Strain X33 merupakan strain *Pichia pastoris* yang akan digunakan untuk proses ekspresi protein rekombinan. Koloni yang tumbuh single koloni kemudian ditumbuhkan pada 5 mL media YPD cair dengan inkubasi 28 °C *overnight* dengan shaker 250 rpm. Kemudian inokulasi kembali 0,1-0,5 mL kultur *overnight* ke 50 mL media YPD baru, dan diinkubasi kembali *overnight* pada 28 °C di shaker 250 rpm sampai OD₆₀₀ = 1,3-1,5. Kemudian sentrifugasi sel pada 1500 x g selama 5 menit di 4 °C. Kemudian diresuspensi dengan 25 mL aquabidest steril dingin. Sentrifugasi sel pada 1500 x g selama 5 menit di 4 °C, kemudian ditambahkan 25 mL aquabidest steril dingin. Sentrifugasi sel pada 1500 x g selama 5 menit di 4 °C, kemudian ditambahkan 2 mL 1M sorbitol dingin. Sentrifugasi sel pada 1500 x g selama 5 menit di 4 °C, tambahkan 100 uL 1M sorbitol dingin sampai volume akhir 150 uL. Simpan sel pada es dan gunakan pada hari yang sama. Jangan menyimpan sel.

c. Transformasi plasmid rekombinan strain *Pichia pastoris* X33

Plasmid rekombinan koloni 11 dan kontrol negatif pPICZαA ditransformasi ke sel kompeten *Pichia pastoris* X33 menggunakan metode electroporator (Bio-Rad Gene Pulser). Protocol yang digunakan untuk *Pichia pastoris*. *Thawing* sel dan sampel, kemudian disiapkan microcentrifuge tube 1.5 mL larutan sorbitol 1 M dan kuvet elektroforator 0.2 cm yang disimpan pada es. Dicampurkan 40 uL sel kompeten X33 dan 15 uL hasil purifikasi linierisasi (konsentrasi DNA 1.447 ng) pada kuvet dingin. Campuran diinkubasi pada es selama 5 menit. Pada tampilan awal alat electroporator, buka *Gen Pulser Xcell*, kemudian

Fungal Protocol screen (tekan 4, kemudian enter 2 enter). Untuk memilih *P. pastoris*, tekan 5 dan tekan enter untuk melihat detail protokol *P. pastoris screen*. Campuran dibiarkan berada pada dasar kuvet, kemudian tempatkan kuvet pada *Shock Pod* kemudian tekan *pulse*. Pulse parameter kemudian dicatat, hasil voltase menunjukkan 1978 V dan *time constant* sebanyak 4,9 ms. Kuvet kemudian segera diambil dan segera tambahkan 1 mL 1M Sorbitol dingin. Pindahkan isi kuvet ke tabung steril 2 mL. Inkubasi pada 28 °C tanpa dishaker selama 1 jam. Kemudian ditanam 200 µl pada media YPD yang mengandung 100 µg/ml Zeocin. Inkubasi pada 28 °C selama 3-10 hari sampai terbentuk koloni.



Gambar 79 Hasil transformasi plasmid rekombinan pada *P. pastoris* strain GS115 **dengan** modifikasi stop kodon

d. Identifikasi transformant plasmid rekombinan di *Pichia pastoris*

e.1. Isolasi DNA plasmid rekombinan di *Pichia pastoris*.

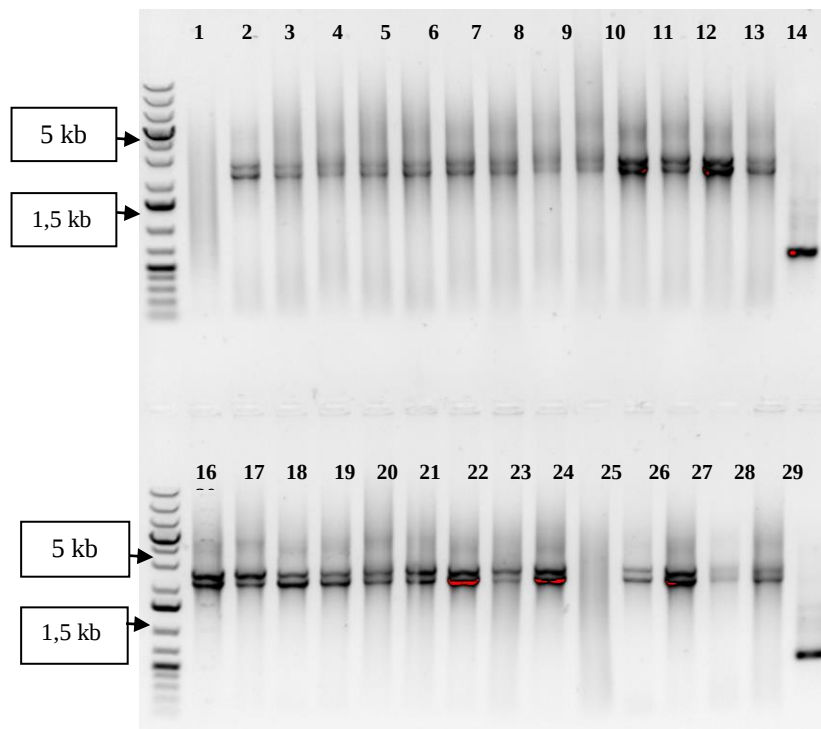
Dilakukan kultur single koloni pada medium YPD (Yeast Extract Peptone Dextrose Medium) dengan campuran 1% yeast extract (oxoid, 416451), 2% peptone (Himedia, cat. 91249-500 g lot no. BCBP8880), 2% dextrose (RM016-500 G lot no. 0000043079) yang mengandung 100 µg/mL zeocin. Kemudian diinkubasi pada suhu 28 °C selama overnight dengan shaker 250 rpm. Isolasi DNA plasmid rekombinan manual di *Pichia pastoris* dengan cara sebagai berikut:

Kultur yeast overnight dipanen, dengan sentrifuge selama 5 menit pada 1200xg suhu ruang, kemudian dibuang supernatan. Pelet diresuspen dengan destilated water steril, dan disentrifuge selama 5 menit pada 1200xg suhu ruang, kemudian dibuang supernatan. Tahap

selanjutnya adalah memecah cell pichia. Resuspen pelet dengan 200 uL breaking buffer (2% (v/v) Triton X-100, 1% (v/v) Sodium Dodecyl Sulfate (SDS), 1mM NaCl, 10 mM Tris.Cl, pH 8.0, 1 mM EDTA, pH 8.0), campuran dipindahkan pada tube 1.5 mL, kemudian ditambahkan dengan glass beads setara dengan volume pellet. Ditambahkan 200 uL phenol/kloroform/Isoamylalkohol (25:24:1). Campuran kemudian divortex dengan kecepatan 8 selama 3 menit. Dilakukan tepat waktu, karena vortex terlalu lama dapat merusak DNA. Tambahkan 200 uL TE buffer dan vortex sebentar. Kemudian disentrifuge selama 5 menit pada 13.000 rpm suhu ruang, supernatan dipindahkan pada tabung baru. Kemudian ditambahkan 1 mL ethanol 100%, bolak balikan tabung kemudian disentrifuge selama 5 menit pada 13.000 rpm suhu ruang, supernatan dibuang kemudian resuspen pellet dengan 400 uL TE buffer. Tahap selanjutnya adalah menghilangkan kontaminan RNA dan mendapatkan DNA. Ditambahkan 30 uL DNase free-RNaseA 1 ug/mL, campur kemudian diinkubasi pada 37 °C selama 5 menit. Kemudian ditambahkan dengan 10 uL 4 M Ammonium Asetat dan 1 mL ethanol 100 %, kemudian pipet *up and down*. Campuran kemudian disentrifuge dengan kecepatan 14000 rpm selama 3 menit pada suhu ruang. Supernatan dibuang dan peletdikeringkan. Resuspen DNA dengan 100 uL TE Buffer, kemudian dihitung konsentrasi DNA yang diperoleh dengan NanoView.

e.2. Identifikasi transformant plasmid rekombinan di Pichia pastoris dengan PCR

Identifikasi transformant plasmid rekombinan di Pichia pastoris dilakukan dengan PCR menggunakan primer spesifik AOX. Prosedur kerja PCR yang dilakukan sebagai berikut: campurkan Accuprime Supermix 22.5 uL, primer forward AOX 1 uL, primer reverse AOX 1 uL, dan cetakan DNA dengan konsentrasi maksimal sebanyak 200 ng/uL. Siklus suhu yang digunakan dengan primer AOX adalah denaturasi awal 94°C selama 2 menit, denaturasi pada 94°C selama 1 menit, annealing pada 55°C selama 1 menit, ekstensi 72 °C selama 3 menit dengan pengulangan sebanyak 40 siklus. Hasil identifikasi dengan primer AOX apabila mengandung plasmid rekombinan hasilnya akan diperoleh dua pita yakni pita DNA prM/E dengan ukuran 1983 pb dan pita gen AOX1 pada ukuran kurang lebih 2.200 pb. Hasil PCR kemudian dianalisis dengan elektroforesis gel agarose 1%. Dilanjutkan dengan visualisasi *GelDoc*. Hasil PCR dengan AOX dapat dilihat pada gambar berikut ini.



Urutan well:

Marker 1 kb Fermentas

1. PCR AOX *pichia* rekombinan 1
2. PCR AOX *pichia* rekombinan 2
3. PCR AOX *pichia* rekombinan 3
4. PCR AOX *pichia* rekombinan 4
5. PCR AOX *pichia* rekombinan 5
6. PCR AOX *pichia* rekombinan 6
7. PCR AOX *pichia* rekombinan 7
8. PCR AOX *pichia* rekombinan 8
9. PCR AOX *pichia* rekombinan 9
10. PCR AOX *pichia* rekombinan 10
11. PCR AOX *pichia* rekombinan 11
12. PCR AOX *pichia* rekombinan 12
13. PCR AOX *pichia* rekombinan 13
14. PCR AOX kontrol positif (*pichia* rekombinan Denv 1)
15. PCR AOX kontrol negatif (pPICZalfaA)

Urutan well:

Marker 1 kb Fermentas

16. PCR AOX *pichia* rekombinan 14
17. PCR AOX *pichia* rekombinan 15
18. PCR AOX *pichia* rekombinan 16
19. PCR AOX *pichia* rekombinan 17
20. PCR AOX *pichia* rekombinan 18
21. PCR AOX *pichia* rekombinan 19
22. PCR AOX *pichia* rekombinan 20
23. PCR AOX *pichia* rekombinan 21
24. PCR AOX *pichia* rekombinan 22
25. PCR AOX *pichia* rekombinan 23
26. PCR AOX *pichia* rekombinan 24
27. PCR AOX *pichia* rekombinan 25
28. PCR AOX *pichia* rekombinan 26
29. PCR AOX kontrol positif (*pichia* rekombinan Denv 1)
30. PCR AOX kontrol negatif (pPICZalfaA)

VI KESIMPULAN DAN SARAN

6.1 Kesimpulan

Penelitian tahun 2016 yang dilaksanakan di institusi PBTDK (yang merupakan bagian dari konsorsium riset vaksin dengue) telah diperoleh hasil kultur DENV-1,-2,-3,-4 strain kandidat vaksin. Penyiapan isolat DENV-1,-2,-3 dan DENV-4 strain kandidat vaksin digunakan sebagai bahan pengembangan vaksin dan bahan uji untuk seluruh institusi di konsorsium yang menggunakan isolat Indonesia seragam terpilih dari koleksi Balitbangkes tahun 2009 yang sudah mendapat persetujuan Komisi Etik. Untuk kandidat vaksin subunit protein rekombinan, telah diperoleh plasmid rekombinan prM/E DENV-1 genotipe I dan IV, prM/E DENV-2, DENV-3 dan DENV-4 yang telah diverifikasi dengan metode digesti, PCR dan sekuensing (telah terkarakterisasi). Kemudian telah diperoleh juga hasil transformasi plasmid rekombinan ke sel inang *yeast P. pastoris* menjadi *P. pastoris* rekombinan prM/E DENV-1,-2,-3,-4 yang telah diverifikasi dengan metode PCR. Untuk *P. pastoris* rekombinan prM/E DENV-1 dan DENV-4 telah diverifikasi juga dengan metode sekuensing yang menunjukkan hasil gen pengkode protein rekombinan memiliki homologi (similaritas 100%) dengan sekuen protein aslinya dari *wild type* virus dengue strain Indonesia. Protein rekombinan prM-E DENV-1 dan DENV-4 telah diekspresikan pada sistem *P. pastoris* dan dihasilkan protein yang terlarut (*soluble*) pada supernatant. Selanjutnya telah diperoleh juga protein rekombinan prM/E DENV-1 dan DENV-4 yang telah diverifikasi dengan metode SDS PAGE berukuran sekitar 56 kDa dan dikarakterisasi dengan metode Western Blot yang menunjukkan bahwa protein rekombinan tersebut dapat mengenali antibody preMembran dengue dan antibody prM/E DENV-1,-2,-3,-4 dan tetravalent.

6.2 Keterbatasan penelitian

Keterbatasan penelitian terkait metode eksperimental adalah belum diperoleh protein rekombinan prM/E DENV-2 dan -3 sehingga masih harus dilanjutkan ke proses ekspresi proteinnya. Selain itu juga hambatan stabilitas produksi protein rekombinan prM/E DENV-1 dan DENV-4 yang sudah terverifikasi sebagai antigen yang dapat mengenali antibody juga perlu dilanjutkan ke tahap upscale ekspresi di Bio Farma menggunakan bioreactor sehingga seluruh parameter dapat terkontrol dan menjamin stabilitas produksinya. Keterbatasan reagensia karena efisiensi anggaran sehingga masih perlu dilanjutkan kultur virus dengue strain vaksin dan strain lainnya untuk mendapatkan titer yang tinggi serta untuk pengujian

titer virus. Selain itu perlu dilanjutkan juga proses optimasi purifikasi protein rekombinan prM/E DENV-1 dan DENV-4.

6.3 Saran

Proses ekspresi protein rekombinan prM/E DENV-2 dan -3 masih harus dilanjutkan untuk mendapatkan protein rekombinan prM/E DENV-2 dan -3. Kemudian untuk mengatasi hambatan stabilitas produksi protein rekombinan prM/E DENV-1 dan -4, perlu dilanjutkan ke tahap upscale ekspresi di Bio Farma menggunakan bioreactor sehingga seluruh parameter dapat terkontrol dan menjamin stabilitas produksinya. Selain itu masih perlu dilanjutkan kultur virus dengue strain vaksin dan strain lainnya untuk mendapatkan titer yang tinggi serta untuk pengujian titer virus. Kemudian dilanjutkan juga proses optimasi purifikasi protein rekombinan prM/E DENV-1 dan DENV-4. Proses penelitian akan terus menerus berlangsung sesuai dengan road map, berkolaborasi & bersinergi dengan seluruh institusi penelitian di Indonesia dan industri vaksin PT Bio Farma, sehingga diharapkan terjadi akselerasi kemandirian produk vaksin nasional.

Penelitian pengembangan vaksin merupakan penelitian eksperimental laboratorium yang bersifat sangat dinamis dan merupakan penelitian yang berkelanjutan. Sebagian besar anggaran (>80%) dimanfaatkan untuk pembelian reagensia yang membutuhkan waktu yang lama karena proses tender serta import/indent 2-3 bulan. Dari sisi administrasi disarankan sistem pendanaan yang konsisten dengan mekanisme pengadaan reagensia yang fleksibel memungkinkan penggantian reagensia karena proses optimasi serta tepat waktu.

DAFTAR KEPUSTAKAAN

- Anderson, R., King A.D., Innis B.L., 1992. Correlation of E protein binding with cell susceptibility to dengue 4 virus infection. *J Gen Virol.* 73 (Pt 8): 2155-9.
- Aryati, Trimarsanto, H., Yohan, B., Wardhani, P., Fahri, S., Sasmono, R.T., 2013. Performance of commercial dengue NS1 ELISA and molecular analysis of NS1 gene of dengue viruses obtained during surveillance in Indonesia. *BMC Infect. Dis.* 13, 611. doi:10.1186/1471-2334-13-611
- Beatty, M. E. Stone, A. Fitzsimons, D. W. Hanna, J. N. Lam, S. K.Vong S., et. al. 2010. Best Practices in Dengue Surveillance: A Report From The Asia-Pacific And Americas Dengue Prevention Boards. *PLoS Negl Trop Dis.* 4(11).
- Brien, J.D., Austin, S.K., Sukupolvi-Petty, S., et al., 2010. Genotype-specific neutralization and protection by antibodies against dengue virus type 3. *J Virol.* 84(20): 10630-43.
- Butrapet, S., Huang, C.Y., Pierro, D.J., Bhamarapravati, N., Gubler, D.J., Kinney, R.M., 2000. Attenuation markers of a candidate dengue type 2 vaccine virus, strain 16681 (PDK-53), are defined by mutations in the 5' noncoding region and nonstructural proteins 1 and 3. *J Virol.* 74(7): 3011-9.
- Capeding, M.R., Tran, N.H., Hadinegoro, S.R., et al. 2014. Clinical efficacy and safety of a novel tetravalent dengue vaccine in healthy children in Asia: a phase 3, randomised, observer-masked, placebo-controlled trial. *Lancet.* 384(9951): 1358-65.
- Clements, D.E., Collier, B.A., Lieberman, M.M., et al. 2010. Development of a recombinant tetravalent dengue virus vaccine: immunogenicity and efficacy studies in mice and monkeys. *Vaccine.* 28(15): 2705-15.
- Costa, S.M., Yorrio, A.P., Goncalves, A.J., et al. 2011 Induction of a protective response in mice by the dengue virus NS3 protein using DNA vaccines. *PLoS One.* 6(10): e25685.
- Dewi, B.E., Naiggolan, L., Putri, D.H., et al. 2014. Characterization of dengue virus serotype 4 infection in Jakarta, Indonesia. *Southeast Asian J Trop Med Public Health.* 45(1): 53-61.
- Etemad B, Batra G, Raut R, Dahiya S, Khanam S, Swaminathan S, Khanna N. *An envelope domain III-based chimeric antigen produced in Pichia pastoris elicits neutralizing antibodies against all four dengue virus serotype.* Am. J. Trop. Med. Hyg. 2008;79(3): 353-363
- Flamand M, Megret F, Mathieu M, Lepault J, Rey F.A, Deubel V. *Dengue virus type 1 nonstructural glycoprotein NS1 is secreted from mammalian cells as a soluble hexamer in a glycosylation-dependent fashion.* J. Virol. 1999; 6104-6110.
- Gebhard, L.G., Filomatori, C.V., Gamarnik, A.V., 2011. Functional RNA elements in the dengue virus genome. *Viruses.* 3(9): 1739-56.
- Ghosh A, Dar L. Dengue vaccines: Challenges, development, current status and prospects. *Indian Journal of Medical Microbiology,* (2015) 33(1): 3-15.

Gubler, D.J., Suharyono, W., Lubis, I., Eram, S., Sulianti, S.J., 1979. Epidemic dengue hemorrhagic fever in rural Indonesia. I. Virological and epidemiological studies. *Am J Trop Med Hyg.* 28(4): 701-10.

Gubler DJ. *Dengue and dengue hemorrhagic fever*. Clin Microbiol Rev 1998;11:480-96.

Guzman MG, Vazquez S. The complexity of antibody-dependent enhancement of dengue virus infection. *Viruses* 2010; 2(12): 2649-62.

Guzman MG, Halstead SB, Artsob H, Buchy P, Farrar J, Gubler DJ, Hunsperger E, Kroeger A, Margolis HS, Martinez E, Nathan MB, Pelegrino JL, Simmons C, Yoksan S, Peeling RW. Dengue: a continuing global threat. *Nat Rev Microbiol* 2010; 8(12 Suppl): S7-16.

Heinz, F.X., Stiasny, K., 2012. Flaviviruses and their antigenic structure. *J Clin Virol.* 55(4): 289-95.

Halstead, S.B., 2007. Dengue. *Lancet* 370, 1644–1652. doi:10.1016/S0140-6736(07) 61687-0

Halstead SB. *Pathogenesis of dengue: challenges to molecular biology*. Science. 1988 Jan 29;239(4839):476-81.

Henchal EA, Putnak JR. 1990. The dengue viruses. *Clin Microbiol Rev* 3(4): 376 –96.

Herrero, L. J., A. Zakhary, M. E. Gahan, M. A. Nelson, B. L. Herring, A. J. Hapel, *et al.* 2013. Dengue Virus Therapeutic Intervention Strategies Based On Viral, Vector And Host Factors Involved In Disease Pathogenesis. *Pharmacology & Therapeutics*. 137: 266–282.

Imoto, J., Konishi, E., 2007. Dengue tetravalent DNA vaccine increases its immunogenicity in mice when mixed with a dengue type 2 subunit vaccine or an inactivated Japanese encephalitis vaccine. *Vaccine*. 25(6): 1076-84.

Kanesa-athan N, Sun W, Kim-Ahn G. Safety and immunogenicity of attenuated dengue virus vaccines in human volunteers. *Vaccine* 2001; 19: 3179-88.

Kaufman, B.M., Summers, P.L., Dubois, D.R., Eckels, K.H., 1987. Monoclonal antibodies against dengue 2 virus E-glycoprotein protect mice against lethal dengue infection. *Am J Trop Med Hyg.* 36(2): 427-34.

Kementrian Kesehatan Republik Indonesia. *Capaian indikator program lingkup ditjen PP dan PL tahun 2012*. <http://pppl.depkes.go.id/berita?id=910>

Konishi, E., Mason, P.W., 1993. Proper maturation of the Japanese encephalitis virus envelope glycoprotein requires cosynthesis with the premembrane protein. *J Virol.* 67(3): 1672-5.

Konishi, E., Kosugi, S., Imoto, J., 2006. Dengue tetravalent DNA vaccine inducing neutralizing antibody and anamnestic responses to four serotypes in mice. *Vaccine*. 24(12): 2200-7.

Lindenbach BD and Rice CM. Flaviviruses and their replication. *In Fields Virology*, Fourth Edition, Edited by David M Knipe and Peter M Howly. Published by Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia. 2001.

Mukhopadhyay S, Kuhn RJ, Rossmann MG. *A Structural Perspective of The Flavivirus Life Cycle*. *Nature review. Microbiol* 2005; 3: 13-22.

Mustafa, M.M.S. Agrawal, L.C.V.K. *Dengue Vaccine: The Current Status*. *MJAFI*. 2008; 64 (2): 161-164.

Mosimann, A. L. P., L. de Borbaa, J. Bordignona, P. W. Masonb, C. N. D. dos Santos. 2010. Construction and characterization of a stable subgenomic replicon system of a Brazilian dengue virus type 3 strain (BR DEN3 290-02). *Journal of Virological Methods*. 163: 147–152.

Mulyatno, K.C., Yamanaka, A., Yotopranoto, S., Konishi, E., 2012. Vertical transmission of dengue virus in *Aedes aegypti* collected in Surabaya, Indonesia, during 2008-2011. *Jpn J Infect Dis*. 65(3): 274-6.

Ong, S.H., Yip, J.T., Chen, Y.L., et al. 2008. Periodic re-emergence of endemic strains with strong epidemic potential-a proposed explanation for the 2004 Indonesian dengue epidemic. *Infect Genet Evol*. 8(2): 191-204.

Pengsaa, K., Limkittikul, K., Yoksan, S., Wisetsing, P., Sabchareon, A., 2011. Dengue antibody in Thai children from maternally transferred antibody to acquired infection. *Pediatr Infect Dis J*. 30(10): 897-900.

Putnak, R., J. Fuller, L. V. Zanden, B. L. Innis, D. W. Vaughn. 2003. Vaccination of rhesus macaques against dengue-2 virus with a plasmid DNA vaccine encoding the viral pre-membrane and envelope genes. *Am J Trop Med Hyg* 68(4): 469– 76.

Raviprakash, K., Porter, K.R., Kochel, T.J., et al. 2000. Dengue virus type 1 DNA vaccine induces protective immune responses in rhesus macaques. *J Gen Virol*. 81(Pt 7): 1659-67.

Rothman AL1, Ennis FA. *Immunopathogenesis of Dengue hemorrhagic fever*. *Virology*. 1999 Apr 25;257(1):1-6

Rothman AL. Dengue: defining protective versus pathologic immunity. *J Clin Invest* 2004; 113: 946–51.

Sabchareon, A., Wallace, D., Sirivichayakul, C., et al. 2012. Protective efficacy of the recombinant, live-attenuated, CYD tetravalent dengue vaccine in Thai schoolchildren: a randomised, controlled phase 2b trial. *Lancet*. 380(9853): 1559-67.

Sasmono, T. B.Y., Setianingsih, T.Y., Wardhani, A.P., Rantam, F.A., 2012. Identifikasi genotipe dan karakterisasi genom virus Dengue di Indonesia untuk penentuan prototipe virus bahan pembuatan vaksin Dengue berbasis strain Indonesia. *Prosiding InSINAS*.

Sasmono, R.T., Wahid, I., Trimarsanto, H., Yohan, B., Wahyuni, S., Hertanto, M., Yusuf, I., Mubin, H., Ganda, I.J., Latief, R., Bifani, P.J., Shi, P.-Y., Schreiber, M.J., 2015. Genomic

analysis and growth characteristic of dengue viruses from Makassar, Indonesia. *Infection, Genetics and Evolution*. 32, 165–177. doi:10.1016/j.meegid.2015.03.006

Shrestha, B., Brien, J.D., Sukupolvi-Petty, S., et al. 2010. The development of therapeutic antibodies that neutralize homologous and heterologous genotypes of dengue virus type 1. *PLoS Pathog*. 6(4): e1000823.

Sjatha, F., Takizawa, Y., Kotaki, T., Yamanaka, A., Konishi, E., 2013. Comparison of infection-neutralizing and -enhancing antibody balance induced by two distinct genotype strains of dengue virus type 1 or 3 DNA vaccines in mice. *Microbes Infect*. 15(12): 828-36.

Sumarmo, Wuryadi, S., Gubler, D.J., 1986. Clinical observations on hospitalized patients with virologically confirmed dengue hemorrhagic fever in Jakarta, Indonesia 1975-1983. *Paediatr Indones*. 26(7-8): 137-51.

Wahala WM, Silva AM. The human antibody response to dengue virus infection. *Viruses* 2011; 3(12): 2374-95.

Wang PG, Kudelko M, Lo J, et al. Efficient assembly and secretion of recombinant subviral particles of the four dengue serotypes using native prM and E proteins. *PLoS One* 2009; 4(12): e8325.

Wang S, He R, Anderson R. PrM- and cell-binding domains of the dengue virus E protein. *J Virol* 1999; 73(3): 2547-51.

WHO (World Health Organization). 2010. Situation update of dengue in the SEA Region, 2010

WHO-SEARO, 2011. Comprehensive guidelines for prevention and control of dengue and dengue haemorrhagic fever, Revised and expanded. ed. World Health Organization, New Delhi, India.

Whitehead SS, Blaney JE, Durbin AP, Murphy BR. Prospect for a dengue virus vaccine. www.nature.com/reviews/micro. 2007; (5) 518-528.

CURRICULUM VITAE

Nama : dr. Christina Safira Whinie Lestari, M.Kes
Kebangsaan : Indonesia
Jenis Kelamin : Perempuan
Tempat & tanggal lahir : Semarang, Jawa Tengah, 6 Desember 1969
Alamat Kantor : Percetakan Negara 29, Jakarta 10560
Telp : 62-21-4261088 ext. 239
Alamat Rumah : Flamboyan VIII No. 10 , Menteng Dalam, Tebet, JakSel
Telp/Fax : 62-21-8299622. HP: 081 385 498 016
Jabatan : Peneliti di Pusat Penelitian & Pengembangan Biomedis dan Farmasi, Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan, Depkes.
Alamat Email : whinielestari@yahoo.com

Pendidikan

1995 : Dokter (Fakultas Kedokteran Universitas Udayana, Bali)
2008 : S 2 (Epidemiologi Klinis), Fakultas Kedokteran Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta
2015 : S 3 (Ilmu Biomedik), Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia, Jakarta

Pengalaman Kerja

1995-1998 : Kepala Puskesmas (Puskesmas Porto Haria, Maluku Tengah)
1998-1999 : Dokter di RSUD Dr. Haulussy (Ambon, Maluku)
1999-2000 : Peneliti di Pusat Penelitian Penyakit Menular, Badan Litbangkes Depkes
2000-2006 : Peneliti di Pusat Penelitian dan Pengembangan Pemberantasan Penyakit, Badan Litbangkes Depkes
2006-sekarang: Peneliti di Pusat Penelitian dan Pengembangan Biomedis dan Farmasi, Badan Litbangkes Depkes

Organisasi Profesi

2000-sekarang: Ikatan Dokter Indonesia

Penelitian

2000 : - *Immunogenicity and Reactogenicity of Recombinant Hepatitis B Vaccine* of PT Bio farma (sebagai peneliti)
2001 : - Status Kekebalan Difteri dan Tetanus Pada anak Putus Sekolah Setara SD (7-15 tahun) di Jakarta Utara (sebagai PI)
- Survei Status Kekebalan Tetanus Pada Wanita Usia Subur di Jawa Barat dan Sumatera Selatan (sebagai peneliti)

- Serological Survey and Operational Study of Quadrivalen DTwP-HB vaccine (sebagai peneliti)
- 2002 : - Pengembangan Model Penjaringan Imunisasi DT Pada Anak Putus Sekolah (umur 7-15 tahun) di Jakarta Utara (sebagai PI)
- 2003 : - *Immunogenicity and Safety of DTwP (Bio Farma) Vaccine Combined with Recombinant Hepatitis-B (GCVC) Vaccine in Indonesia Children* (sebagai peneliti)
- Analisis Cohor Tuberkulin Tes Pasca Vaksinasi BCG di Tangerang (sebagai peneliti)
- 2004 : - Status Kekebalan Difteri Pada Murid SMP Kls III dan SMA Kls II di Kabupaten Badung, Bali dan Cianjur, Jawa (sebagai PI)
- *Feasibility and Logistics of Vaccinating School Children in North Jakarta with Typhoid Fever Vi Vaccine* (sebagai peneliti)
- 2005 : - Seroepidemiologi Preimunisasi Campak – Rubella dan Pasca Imunisasi DPT-HB Combo di Surabaya dan Bali (sebagai peneliti)
- 2006 : - Studi Epidemiologi Molekuler Dari Virus Dengue di 4 Provinsi (DKI, Medan, Semarang, Pontianak) sebagai peneliti
- Early Warning Outbreak Recognition System (sebagai peneliti)
- 2007 : - Uji Diagnostik Metode Multiplex Flow Cytometry Immunoassay untuk deteksi Ig M Campak dan Rubella Pada Tatalaksana KLB Campak (sebagai PI)
- Riset Kesehatan Dasar di Kabupaten Tegal (sebagai PI)
- 2008 : - Analisis Lanjut Riskesdas: Dampak Status Imunisasi Pada Anak Balita di Indonesia (sebagai PI)
- 2009 : - Produksi dan Karakterisasi Imunogenisitas Protein Non Struktural 1 Virus Dengue Serotipe 1 Strain Indonesia Untuk Pengembangan Kandidat Vaksin Dengue (sebagai PI)
- Pemeriksaan Spesimen Biomedis Riskesdas 2007/2008 Metode Serologi ELISA (sebagai koordinator)
- 2010 : - Produksi dan Karakterisasi Imunogenisitas Protein Non Struktural 1 Virus Dengue Serotipe 1 Strain Indonesia Bagi Pengembangan Kandidat Vaksin Dengue, tahap II (sebagai PI)
- Pemeriksaan Spesimen Biomedis Riskesdas 2007/2008 Metode Serologi ELISA, Lanjutan (sebagai koordinator)
- 2011 : - Pemeriksaan Spesimen Biomedis Riskesdas 2007/2008 Metode Serologi ELISA, Lanjutan (sebagai PI)
- 2012 : - Status kekebalan dan efikasi protektif Vaksin Subunit Protein Rekombinan NS 1-Dengue 1 (Strain Indonesia, Bekasi 2003915846) pada Mencit (Balb/c) (sebagai PI)
- 2013 : - Pengembangan Vaksin Dengue Isolat Indonesia (Konsorsium Riset vaksin Dengue) (sebagai PI)
- Konstruksi Plasmid Rekombinan NS3 Dengue Serotipe 1 dan 3 Strain Indonesia untuk pengembangan vaksin Dengue (sebagai PI)
- 2014 : - Pengembangan Vaksin Dengue Isolat Indonesia tahap 2 (Konsorsium Riset Vaksin Dengue) (sebagai PI)
- 2015 : - Konstruksi Gen dan Plasmid Rekombinan prM/E Dengue Serotipe 1 untuk Pengembangan Vaksin Dengue (sebagai PI)
- Pengembangan Vaksin Dengue Isolat Indonesia tahap 3 (Konsorsium Riset Vaksin Dengue) (sebagai PI)

2016 : - Pengembangan Vaksin Dengue Tetravalen Sub Unit Protein Rekombinan prM/E Strain Indonesia, Tahun ke-2 (Th 2016) (sebagai PI)

Paten

1. Sekuens cDNA dari Non Struktural 1 (NS1) Virus Dengue Serotype 1 Strain Indonesia (Bekasi 20039125846): Produksi dan Karakterisasi Immunogenisitas Protein Rekombinan Non Struktural 1 (NS1) Virus Dengue Serotype 1 Strain Indonesia. Nomer Pendaftaran Paten: P00201505724, tanggal 15-9-2015, Kementerian Hukum dan Hak Asasi Manusia RI, Dirjen Hak Kekayaan Intelektual. Inventor: C.S. Whinie Lestari, Agus Sjarurachman, Tjahjani Mirawati Soediro, Vanny Narita.

Publikasi

1. **C.S Whinie Lestari**, Dyah Widyaningrum, Sumarno, Farida Siburian. Status Kekebalan Terhadap Difteri dan Tetanus Pada Anak Putus Sekolah Setara SD (Umur 7 – 15 tahun) di Kotamadya Jakarta Utara. Buletin Penelitian Kesehatan. 2006; 34 (4):152 – 160.
2. Sarwo Handayani, **C.S. Whinie Lestari**, Sumarno, Dewi Parwati. Uji Serologi Setelah Imunisasi Hepatitis B 3 Dosis di Puskesmas Daerah Bogor dan Padang, Buletin Penelitian Kesehatan. 2005;33(3):111 – 120.
3. Dina Bisara Lolong, Felly P Senewe, **C.S. Whinie Lestari**. Analisis Kohor Tuberkulin Tes Pasca Vaksinasi BCG, Majalah Kesehatan Perkotaan. 2004;11 (2) 30 – 39.
4. **C.S. Whinie Lestari**, Dyah Widyaningrum, Dewi Parwati. Pengembangan Model Intervensi Penjarangan Imunisasi DT dan TT (BIAS) pada Anak Putus Sekolah Setara SD. Media Litbangkes. 2003;13(2): 16-20.
5. **C.S.Whinie Lestari**, Emiliana Tjitra, Sandjaya. Dampak Status Imunisasi Anak Balita di Indonesia terhadap Kejadian Penyakit. Media Litbangkes. 2009;Supl II (19): S5-S12.
6. **C.S.Whinie Lestari** dan Retno Gitawati. Penyakit menular non neglected, Kajian Program dan Penelitian, buku 2 (Bab 7. Hepatitis) dalam Buku Seri Kajian Litbangkes no. 12/2013, Balitbangkes, Kemkes RI 2013, ISBN: 978-602-235-480-2.
7. Presentasi Oral pada Simposium Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan, Departemen Kesehatan RI, Jakarta Desember 2010 dengan judul Hasil Pemeriksaan Spesimen Biomedis Riskedas 2007/2008, Metode Serologi ELISA.
8. Djoko Kartono dan **Whinie Lestari**. Status sosial-ekonomi dan kadar hormon tirotopin rumah tangga pengguna garam beriodium di perkotaan Indonesia: Analisis data Riskedas 2007. Penel Gizi Makan 2012, 35(2):1-9.
8. Laurentia Miharja, Marleta Dewi, **C.S. Whinie Lestari**, dkk. Buku Laporan Riskedas Bidang Biomedis Tahun 2007. Badan Litbangkes, Kemkes RI. 2012. ISBN:978-602-235-206-8.
9. Presentasi Oral pada Seminar Nasional Insentif Riset Sinas Tahun 2013, Jakarta 7-8 November 2013 dengan judul Pengembangan Vaksin Dengue Isolat Indonesia.
10. Tegar Adriansyah Putra Siregar, T Mirawati Sudiro, **Whinie Lestari**, and Beti Ernawati Dewi. Some Epitopes Conservation in Non Structural 3 Protein Dengue Virus Serotype 4. Health Science Journal of Indonesia 2015, 6(2):126-131

11. **C.S.Whinie Lestari**, Fedik A. Rantam, Beti Ernawati Dewi et al. Pengembangan Vaksin Dengue Isolat Indonesia dalam Prosiding SeMinar Nasional Insentif Riset Sinas: Membangun Sinergi Riset Nasional Untuk Kemandirian Teknologi. Bidang Teknologi Kesehatan Obat. Kementerian Riset dan Teknologi 2013. ISBN 978-602-18926-6-4
12. Presentasi Oral pada Simposium Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan, Departemen Kesehatan RI, Jakarta Desember 2010 dengan judul Hasil Pemeriksaan Spesimen Biomedis Riskedas 2007/2008, Metode Serologi ELISA.
13. Presentasi Oral pada Seminar Nasional Insentif Riset Sinas Tahun 2013, Jakarta 7-8 November 2013 dengan judul Pengembangan Vaksin Dengue Isolat Indonesia.
14. Presentasi Oral pada Seminar Insentif Riset Sistem Inovasi Nasional "Membangun Sinergi Riset Nasional untuk Kemandirian Teknologi", Bandung 3-4 Desember 2015 dengan judul Pengembangan Vaksin Dengue Isolat Indonesia tahun ke 3, tahun 2015.