

Konstruksi Plasmid Pengekspresi Antigen Rekombinan Berbasis Epitop Multipel untuk Deteksi Antibodi Anti-HCV

Plasmid Construction of Multiple Epitope-Based Recombinant Antigen Expression for the Detection of Anti-HCV Antibodies

Dian Amirulloh,¹ Silvia Tri Widyaningtyas,² dan Budiman Bela^{*2,3}

¹Program Magister Ilmu Biomedik, Fakultas Kedokteran, Universitas Indonesia, Jl. Salemba Raya No.6 Jakarta Pusat 10430, Indonesia

²Pusat Riset Virologi dan Kanker Patobiologi, Fakultas Kedokteran, Universitas Indonesia, Rumah Sakit Cipto Mangunkusumo, Jl. Salemba Raya No.4 Jakarta Pusat 10430, Indonesia

³Departemen Mikrobiologi, Fakultas Kedokteran, Universitas Indonesia, Jl. Pegangsaan Timur No.16 Jakarta Pusat 10320, Indonesia

*Korespondensi: budiman.bela@yahoo.com

Submitted: 02-07-2018; *Revised:* 13-09-2018; *Accepted:* 17-09-2018

DOI: <https://doi.org/10.22435/mpk.v28i3.39>

Abstrak

Infeksi *hepatitis C virus* (HCV) dapat menyebabkan penyakit hati kronis yang berkembang menjadi sirosis dan kanker hati. Diperkirakan terdapat lebih dari 170 juta penduduk dunia menderita HCV. Diagnosis yang akurat diperlukan untuk memberikan penanganan tepat secara dini, termasuk mencegah penularan virus tersebut lebih lanjut. Tujuan penelitian ini adalah mengonstruksi plasmid pengekspresi antigen rekombinan untuk deteksi antibodi anti-HCV. Gen pengode antigen tersebut dirancang sedemikian rupa sehingga tersusun atas epitop yang bersifat imunodominan, lestari, serta mewakili subtipe HCV yang bersirkulasi di Indonesia maupun global. Selanjutnya gen tersebut dibuat dengan teknik DNA sintetik oleh perusahaan penyedia jasa sintesis DNA dan diterima oleh peneliti dalam bentuk terklona pada plasmid pUC57. Untuk ekspresi pada sel *Escherichia coli*, gen penyandi antigen rekombinan disubklona dari plasmid pUC57 ke plasmid pQE80L dengan situs pengklonaan BamHI dan HindIII. Plasmid rekombinan hasil subklona kemudian dipropagasi pada sel *Escherichia coli* Top10 dan diverifikasi dengan teknik PCR koloni, analisis dengan enzim restriksi dan sekuensing. Gen penyandi antigen rekombinan HCV berbasis epitop multipel (HCV_ME) berukuran 1200 pb. Pengklonaan gen tersebut pada vektor pUC57 menghasilkan plasmid pUC57-HCV_ME (3910 pb) dan subklona pada vektor pQE80L menghasilkan plasmid pQE80L-HCV_ME (5909 pb). Berdasarkan pada hasil verifikasi plasmid pQE80L-HCV_ME pengekspresi antigen rekombinan untuk deteksi antibodi anti-HCV telah berhasil dikonstruksi.

Kata kunci: HCV; kloning; antigen; epitop; diagnosis

Abstract

Hepatitis C virus (HCV) infection can cause chronic liver disease that develops into cirrhosis and liver cancer. It is estimated that are more than 170 million of th world's population suffering from HCV. Accurate diagnosis is needed to provide appropriate early treatmen, including preventing further transmission of the virus. The purpose of this study was to construct plasmid expression of recombinant antigen for detection of anti-HCV antibodies. The antigen coding gene is designed so that is composed to epitopes that are immunodominant, sustainable and and represent HCV subtypes circulating in Indonesia and globally. Furthermore, the gene was made by synthetic DNA techniques by DNA synthesis service providers and accepted by the researchers in the form of blinding on the PUC57 plasmid to pQE80L plasmid with BamHI and HindIII cloning sites. Subcloned recombinant plasmids were then propagated on Top10 Escherichia coli cells and verified by PCR colony tecnique, restriction, and sequencing analysis. HCV recombinant antigen coding gene is 1200 bp. Cloning of these gene on the PUC57 vector produced a plasmid pUC57-

HCV_ME (3910 bp) and subcloned in the pQE80L vector producing pQE80L-HCV_ME plasmid (5909bp). Based on verification results of pQE80L-HCV_ME plasmid the expression of recombinant antigen for detection of anti-HCV antibodies has been successfully constructed.

Keywords: HCV; cloning; antigen; multiepitope; diagnosis

PENDAHULUAN

Hepatitis C virus (HCV) mulai ditemukan sekitar tahun 1989. Virus tersebut merupakan salah satu penyebab utama penyakit hepatitis.¹ Penyakit ini diawali dengan terjadinya infeksi akut, kemudian dapat berkembang menjadi kronis, sirosis, dan lebih jauh lagi menyebabkan kanker hati. Diperkirakan lebih dari 170 juta orang penduduk di dunia menderita HCV.² HCV termasuk virus famili Flaviviridae, genus Hepacivirus dengan genom berupa RNA untai tunggal, *positive sense*, terdiri atas *open reading frame* (ORF) yang diapit oleh *untranslated region* (UTR). ORF menyandi sekitar 3000 asam amino untuk membentuk poliprotein yang terbagi menjadi protein struktural (Core, E1, E2) dan nonstruktural (p7, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A, NS5B).^{3,4} HCV memiliki tingkat variasi genetik yang tinggi, dikelompokkan ke dalam tujuh genotipe dan banyak subtipe dengan distribusi yang berbeda-beda di setiap wilayah.^{5,6}

Diagnosis yang akurat sangat diperlukan untuk memberikan penanganan tepat secara dini, termasuk mencegah penularan virus tersebut secara lebih lanjut.⁷ Metode diagnosis infeksi HCV telah berkembang dengan pesat sejak virus tersebut berhasil diidentifikasi, salah satunya adalah *enzyme immuno assay* (EIA) yang digunakan untuk mendeteksi antibodi anti-HCV. Pengembangan EIA generasi sebelumnya dilakukan menggunakan antigen rekombinan multipel yang terdiri dari protein HCV struktural dan nonstruktural untuk meningkatkan sensitifitas dan spesifisitas diagnostik.⁸ Hal tersebut dilakukan berdasarkan penambahan jumlah dan penggunaan hampir seluruh sekuen antigen. Kelemahan pengembangan tersebut berpotensi dapat meningkatkan kompleksitas antigen, menurunkan efisiensi produksi, dan meningkatkan biaya yang diperlukan. Pengembangan antigen rekombinan HCV berbasis epitop multipel adalah salah satu cara yang dapat dilakukan untuk mengatasi permasalahan tersebut. Antigen rekombinan HCV dapat disusun berdasarkan atas epitop yang bersifat imunodominan, lestari, dan mewakili subtipe HCV baik yang bersirkulasi di Indonesia maupun global.⁹ Tujuan penelitian ini adalah mengonstruksi plasmid pengeksresi antigen rekombinan berbasis epitop multipel untuk deteksi antibodi anti-HCV.

METODE

Kegiatan penelitian dilaksanakan di laboratorium Pusat Riset Virologi dan Kanker Patobiologi, Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia-Rumah Sakit Cipto Mangunkusumo (PRVKP FKUI-RSCM) dari Desember 2017 sampai dengan Maret 2018. Gen penyandi antigen rekombinan HCV dirancang melalui studi bioinformatik dan literatur untuk menentukan epitop dalam penyusunan antigen. Studi bioinformatik dilakukan di antaranya menggunakan piranti lunak NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) untuk memperoleh sekuen *asam amino antigen HCV*, *immune epitope database* (<http://www.iedb.org/>) untuk analisis epitop bersifat imunodominan, kemudian *mega software* dan *bioedit* untuk analisis epitop bersifat lestari. Gen penyandi antigen rekombinan HCV diperoleh dengan teknologi DNA sintetik (dari perusahaan Macrogen) setelah dilakukan optimasi kodon untuk sistem ekspresi pada sel *E. coli*. Optimasi kodon tersebut dilakukan menggunakan piranti lunak *gene designer 2.0* dan *genscript* (<https://www.genscript.com/>).

DNA sintetik antigen rekombinan HCV diperoleh dalam bentuk terklona pada plasmid pUC57 diapit situs restriksi BamHI dan HindIII (plasmid tersebut kemudian diberi nama pUC57-HCV_ME). Sel *E. coli* Top10 digunakan sebagai inang untuk amplifikasi plasmid pUC57-HCV_ME. Sel *E. coli* Top10 dikultur dalam medium luria bertani (LB) cair kemudian dibuat menjadi sel kompeten dengan menggunakan 100 mM MgCl₂ dan 100 mM CaCl₂. Plasmid pUC57-HCV_ME (50 ng/μl) ditransformasi pada sel kompeten *E. coli* Top10 sebanyak 1/10 volume sel dengan cara heat shock pada suhu 38 °C selama 90 detik, kemudian segera dipindahkan pada suhu 4 °C selama 60 detik. Sel *E. coli* Top10 hasil transformasi ditumbuhkan pada LB agar mengandung ampisilin (16 jam, suhu 37 °C). Koloni sel *E. coli* Top10 yang tumbuh dikonfirmasi dengan cara dilakukan isolasi plasmid skala kecil sesuai prosedur Miniprep (Qiagen), kemudian direstriksi menggunakan enzim BamHI dan HindIII (Biolabs), dan hasilnya divisualisasi dengan elektroforesis agarose 0,8% (b/v) 100V 25 menit. Vektor ekspresi yang digunakan dalam penelitian ini adalah plasmid pQE80L (Qiagen) yang disimpan dalam stok kultur sel *E. coli* Top10 di laboratorium. Sel bakteri tersebut ditumbuhkan,

dilakukan isolasi plasmid, dianalisis dengan restriksi enzimatis seperti dilakukan pada plasmid pUC57-HCV_ME, kemudian divisualisasi dengan elektroforesis jel agarose.¹⁰

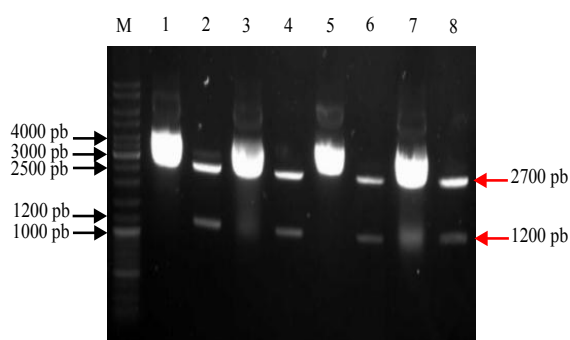
Masing-masing koloni sel *E. coli* Top10 yang positif mengandung plasmid pUC57-HCV_ME dan pQE80L dari hasil isolasi plasmid skala kecil serta analisis restriksi, kemudian dikultur dalam LB cair (500 ml) untuk isolasi plasmid skala besar sesuai prosedur *HiSpeed Maxi Kit* (Qiagen). Analisis restriksi dengan enzim BamHI dan HindIII kembali dilakukan terhadap plasmid pUC57-HCV_ME dan pQE80L hasil isolasi plasmid skala besar, kemudian divisualisasi dengan elektroforesis agarose 0,8% (b/v) 100V 25 menit. Setelah diketahui masing-masing plasmid memiliki ukuran yang sesuai, selanjutnya dilakukan restriksi skala besar untuk menyiapkan DNA sisipan dan vektor ekspresi. Berat masing-masing DNA pada campuran reaksi ini sekitar 10000 ng. Hasil restriksi kemudian dipurifikasi dengan pemisahan pada *low melting agarose* (LMA) dan dilanjutkan dengan tahapan *desalting* sesuai prosedur QiaexII (Qiagen). Khusus vektor ekspresi pQE80L, untuk mencegah autoligasi setelah plasmid tersebut direstriksi, dilakukan reaksi defosfatasi menggunakan enzim *alkaline phosphatase*. Selanjutnya visualisasi DNA hasil purifikasi dilakukan dengan elektroforesis agarose 0,8% (b/v) 100V 25 menit. DNA sisipan dan vektor ekspresi yang berukuran sesuai kemudian diligasi dengan enzim T4 DNA ligase dengan perbandingan konsentrasi antara DNA sisipan dengan vektor 3:1. Campuran reaksi ini kemudian diinkubasi pada inkubator dengan suhu 16 °C selama 16 jam.¹⁰

Reaksi ligasi antara vektor ekspresi dengan DNA sisipan antigen rekombinan HCV akan menghasilkan plasmid rekombinan pQE80L-HCV_ME. Sel *E. coli* Top10 yang telah dibuat kompeten kemudian ditransformasi dengan plasmid tersebut dan ditumbuhkan pada LB agar mengandung ampisilin. Untuk mengetahui keberhasilan konstruksi plasmid tersebut, dilakukan tiga tahap verifikasi yaitu PCR koloni, analisis restriksi, dan sekuensing. Campuran PCR koloni untuk satu reaksi (satu tabung) adalah sebagai berikut: 10 Unit/ μ l enzim Dream Taq polimerase 0,06 μ l, 10x bufer enzim Dream Taq polimerase 1 μ l, 10 mM dNTP mix 0,2 μ l, 25 mM MgCl₂ 0,5 μ l, 10 μ M primer pQE forward 0,2 μ l, 10 μ M primer pQE reverse 0,2 μ l, 1 koloni transforman, dan H₂O sampai volume total 10 μ l. PCR dilakukan terhadap 10 koloni, sebanyak 35 siklus yang terdiri atas tahap denaturasi (95 °C)

30 detik, *annealing* (55 °C) 30 detik, dan *elongasi* (72 °C) 45 detik. Selanjutnya visualisasi hasil PCR koloni dilakukan dengan elektroforesis agarose 0,8% (b/v) 100V 25 menit. Klon yang positif dari hasil PCR koloni kemudian diverifikasi lebih lanjut dengan analisis restriksi menggunakan enzim BamHI dan HindIII. Klon yang positif berdasarkan dua tahap verifikasi tersebut kemudian digunakan untuk analisis sekuensing dengan metode Sanger.¹⁰

HASIL

Konstruksi plasmid pengekspresi antigen rekombinan HCV diawali dengan penyiapan DNA sisipan. Setelah diperoleh gen penyandi antigen rekombinan HCV yang dibuat melalui teknologi DNA sintetik dan telah terklona dalam bentuk plasmid pUC57-HCV_ME, plasmid tersebut kemudian ditransformasi pada sel *E. coli* Top10. Konsentrasi plasmid pUC57-HCV_ME hasil isolasi plasmid skala kecil dari empat buah koloni masing-masing 228,4 ng/ μ l, 198,1 ng/ μ l, 201,3 ng/ μ l, dan 224,3 ng/ μ l. Plasmid tersebut kemudian dianalisis dengan enzim restriksi BamHI dan HindIII, kemudian hasilnya divisualisasi dengan elektroforesis jel agarose (Gambar 1). Plasmid pUC57-HCV_ME yang tidak dipotong enzim restriksi berukuran 3910 pb (lajur 1, 3, 5, dan 7). Plasmid pUC57-HCV_ME yang dipotong enzim restriksi (lajur 2, 4, 6, dan 8) pada elektroforesis jel agarose menghasilkan dua fragmen DNA, masing masing terdiri atas DNA sisipan HCV_ME berukuran 1200 pb dan kerangka plasmid pUC57 berukuran 2710 pb.



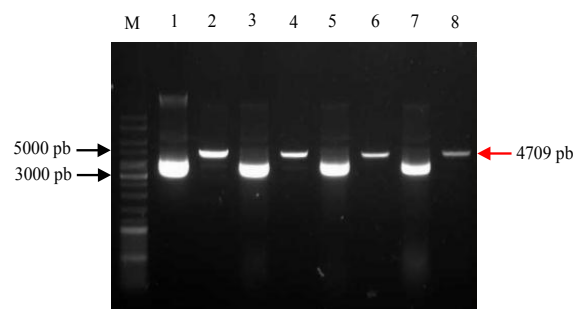
Gambar 1. Elektroforesis Jel Agarose Plasmid pUC57-HCV_ME Hasil Isolasi Skala Kecil Dari Sel *E. coli* Top10. M: Marka. Lajur 1, 3, 5, 7: Plasmid pUC57-HCV_ME dari Koloni 1, 2, 3, dan 4 Tidak Dipotong Enzim Restriksi. Lajur 2, 4, 6, 8: Plasmid pUC57-HCV_ME dari Koloni 1, 2, 3, dan 4 Dipotong dengan Enzim Restriksi BamHI dan HindIII

Selanjutnya penyiapan vektor ekspresi dilakukan dengan menumbuhkan sel *E. coli* Top10 yang mengandung plasmid pQE80L dari stok kultur yang ada di laboratorium. Konsentrasi plasmid pQE80L hasil isolasi plasmid skala kecil dari empat buah koloni masing-masing 164,5 ng/μl, 139,8 ng/μl, 172,5 ng/μl, dan 155,8 ng/μl. Plasmid tersebut kemudian dianalisis dengan enzim restriksi BamHI dan HindIII. Visualisasi elektroforesis jel agarose terhadap hasil restriksi tersebut ditunjukkan pada Gambar 2. Plasmid pQE80L yang tidak dipotong oleh enzim restriksi berukuran 4751 pb (plasmid pQE80L *wild type*) (lajur 1, 3, 5, dan 7). Selanjutnya pemotongan dengan enzim restriksi BamHI dan HindIII, menjadikan plasmid tersebut berukuran 4709 pb, residu fragmen DNA 42 pb tidak terlihat pada visualisasi jel agarose (lajur 2, 4, 6, dan 8).

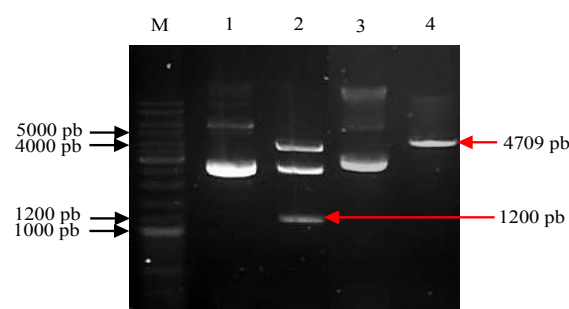
Setelah mendapatkan ukuran pita DNA yang sesuai berdasarkan elektroforesis jel agarose (analisis Gambar 1 dan 2), salah satu koloni (dipilih koloni 1) digunakan untuk isolasi plasmid skala besar. Isolasi plasmid tersebut yaitu plasmid pUC57-HCV_ME untuk menyiapkan DNA sisipan dan plasmid pQE80L untuk menyiapkan vektor ekspresi. Konsentrasi plasmid pUC57-HCV_ME dan pQE80L yang diperoleh dari hasil isolasi ini masing-masing yaitu 255,8 ng/μl dan 82,5 ng/μl. Plasmid tersebut kemudian dikonfirmasi dengan analisis restriksi (BamHI dan HindIII), dan hasilnya divisualisasi dengan elektroforesis jel agarose (Gambar 3). Pita DNA sisipan antigen rekombinan HCV berukuran 1200 pb, ditunjukkan pada lajur 2. Adapun plasmid pQE80L yang telah dipotong enzim restriksi berukuran sebesar 4709 pb (lanjur 4). Hal ini sesuai dengan hasil isolasi plasmid sebelumnya pada skala kecil. Plasmid pUC57-HCV_ME (lajur 1) dan pQE80L (lajur 3) yang tidak dipotong oleh enzim restriksi masing-masing berukuran 3910 pb dan 4751 pb. Pada lajur kedua Gambar 3 tampak pita DNA berukuran sekitar 4000 pb yang berada di atas pita berukuran sekitar 2710 pb. Pita berukuran sekitar 4000 pb tersebut diduga adalah plasmid pUC57-HCV_ME (3910 pb) yang tidak terpotong sempurna oleh enzim restriksi atau hanya terpotong oleh salah satu dari dua enzim restriksi yang digunakan (BamHI dan HindIII).

Setelah memperoleh hasil yang sesuai pada analisis restriksi plasmid dari hasil isolasi skala besar, selanjutnya dilakukan restriksi skala besar (sekitar 10000 ng) untuk penyiapan ligasi antara DNA sisipan dan vektor ekspresi. Hasil restriksi ini dipurifikasi kemudian divisualisasi dengan elektroforesis jel agarose (Gambar 4). Lajur 1 dan 2 masing-masing menunjukkan

pita DNA sisipan antigen rekombinan HCV berukuran 1200 pb dan vektor ekspresi pQE80L berukuran 4709 pb. Adapun konsentrasi DNA yang diperoleh dari hasil purifikasi ini yaitu 14,3 ng/μl untuk DNA sisipan antigen rekombinan HCV dan 37,5 ng/μl untuk plasmid pQE80L.



Gambar 2. Elektroforesis Jel Agarose Plasmid pQE80L Hasil Isolasi Skala Kecil dari Sel *E. coli* Top10. M: Marka. Lajur 1, 3, 5, 7: Plasmid pQE80L dari Koloni 1, 2, 3, dan 4 Tidak Dipotong Enzim Restriksi. Lajur 2, 4, 6, 8: Plasmid pQE80L dari Koloni 1, 2, 3, dan 4 Dipotong Dengan Enzim Restriksi BamHI dan HindIII



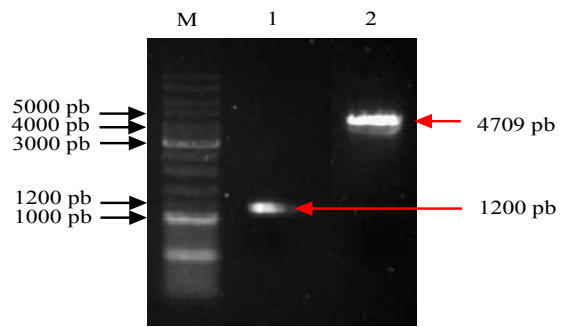
Gambar 3. Elektroforesis Jel Agarose Plasmid pUC57-HCV_ME dan pQE80L Hasil Isolasi Skala Besar dari sel *E. coli* Top10. M: Marka. Lajur 1 dan 3: Plasmid pUC57-HCV_ME dan pQE80L Tidak Dipotong Enzim Restriksi. Lajur 2 dan 4: Plasmid pUC57-HCV_ME dan pQE80L Dipotong dengan Enzim Restriksi BamHI dan HindIII.

Ligasi antara DNA sisipan antigen rekombinan HCV (1200 pb) dengan vektor ekspresi pQE80L (4709 pb) menghasilkan plasmid rekombinan pQE80L-HCV_ME (5909 pb). Tabel 1 menunjukkan jumlah koloni sel *E. coli* Top10 hasil transformasi plasmid pQE80L-HCV_ME yang tumbuh pada medium LB

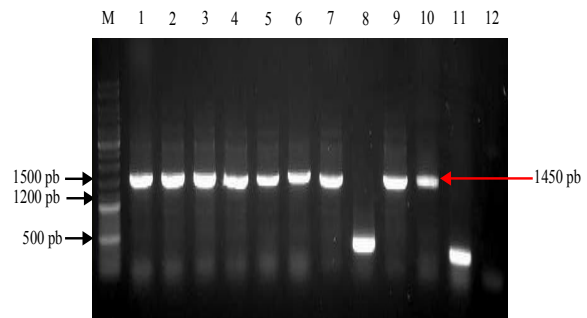
agar mengandung ampisilin. Sebagai kontrol, disertakan pula transformasi plasmid pQE80L (4709 pb) hasil purifikasi setelah direstriksi oleh enzim BamHI dan HindIII dan plasmid pQE80L (4751 pb) *wild type* atau tidak dipotong oleh enzim restriksi BamHI dan HindIII. Selain itu disertakan pula sel *E. coli* Top10 yang tidak ditransformasi oleh plasmid.

Untuk memverifikasi keberhasilan konstruksi plasmid pQE80L-HCV_ME sebagai pengeksresi antigen rekombinan HCV, tahap pertama dilakukan PCR koloni. Sebanyak 9 dari 10 koloni yang dianalisis dengan PCR menunjukkan hasil positif. Hal ini ditandai dengan adanya pita DNA dengan ukuran sekitar 1450 pb (lajur 1-7 dan 9-10). Lajur 8 adalah koloni negatif dari hasil analisis PCR, sementara lajur 11 dan 12 masing-masing adalah kontrol positif dan kontrol negatif reaksi PCR. Pada kontrol positif digunakan plasmid pQE80L *wild type* pada campuran reaksi PCR sebagai DNA *template* (menghasilkan pita DNA berukuran sekitar 250 pb). Sementara pada kontrol negatif, tidak terdapat DNA *template* dalam campuran reaksi PCR, sehingga tidak menghasilkan pita DNA pada elektroforesis jel agarose (Gambar 5).

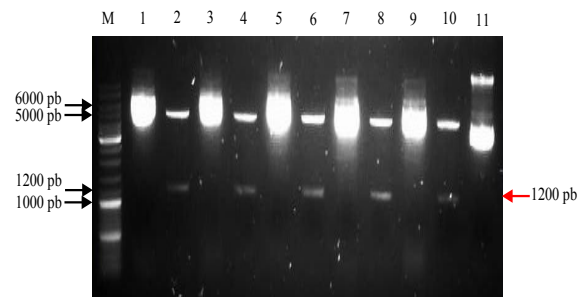
Selanjutnya verifikasi tahap kedua adalah analisis restriksi. Plasmid pQE80L-HCV_ME diisolasi dari koloni sel *E. coli* Top10 yang positif berdasarkan analisis PCR (dipilih koloni 1-5). Dari hasil isolasi tersebut diperoleh konsentrasi plasmid pQE80L-HCV_ME berturut-turut 115,9 ng/μl, 81,9 ng/μl, 100,4 ng/μl, 101,5 ng/μl, dan 106,2 ng/μl. Plasmid tersebut kemudian dipotong dengan enzim restriksi BamHI dan HindIII yang hasilnya ditunjukkan pada Gambar 6. Plasmid pQE80L-HCV_ME yang tidak dipotong enzim restriksi berukuran 5909 pb (lajur 1, 3, 5, 7 dan 9). Sedangkan plasmid pQE80L-HCV_ME yang dipotong enzim restriksi menghasilkan dua pita DNA pada elektroforesis jel agarose. Pita tersebut masing-masing berukuran 4709 pb dan 1200 pb yang berasal dari vektor ekspresi pQE80L dan DNA sisipan antigen rekombinan HCV. Lajur 11 adalah plasmid pQE80L *wild type* (4751 pb) yang tidak dipotong oleh enzim restriksi yang berfungsi sebagai kontrol. Plasmid pQE80L-HCV_ME (dipilih dari koloni nomor 1) digunakan untuk verifikasi tahap ketiga yaitu analisis sekuensing. Hasilnya menunjukkan tidak terdapat mutasi pada susunan DNA penyandi antigen rekombinan HCV (hasil sekuensing tidak dilampirkan karena dalam proses pengajuan hak paten).



Gambar 4. Elektroforesis Jel Agarose Hasil Purifikasi DNA Sisipan dan Vektor Ekspresi. M: Marka. Lajur 1: DNA Sisipan HCV_ME. Lajur 2: Vektor Ekspresi pQE80L



Gambar 5. Elektroforesis Jel Agarose Hasil PCR Koloni *E. coli* Top10. M: Marka. Lajur 1-10: Koloni *E. coli* Top10 Hasil Transformasi Plasmid pQE80L-HCV_ME. Lajur 11: Kontrol Positif PCR Koloni. Lajur 12: Kontrol Negatif PCR Koloni.



Gambar 6. Elektroforesis Jel Agarose Hasil Restriksi Plasmid pQE80L-HCV_ME. M: Marka. Lajur 1, 3, 5, 7, 9: Plasmid pQE80L-HCV_ME dari Koloni 1, 2, 3, 4, dan 5 Tidak Dipotong Enzim Restriksi. Lajur 2, 4, 6, 8, 10: Plasmid pQE80L-HCV_ME dari Koloni 1, 2, 3, 4, dan 5 dipotong dengan Enzim Restriksi BamHI dan HindIII. Lajur 11: Plasmid pQE80L *wild type* Tidak Dipotong Enzim Restriksi.

Tabel 1. Koloni Sel *E. coli* Top10 Hasil Transformasi

DNA yang ditransformasi	Jumlah koloni yang tumbuh
pQE80L-HCV_ME (Plasmid hasil ligasi)	342
pQE80L hasil restriksi enzim BamHI dan HindIII (Kontrol ligasi)	7
pQE80L <i>wild type</i> (Kontrol positif transformasi)	900
Kontrol negatif transformasi (<i>E. coli</i> Top10 tanpa diberi plasmid)	0

PEMBAHASAN

Diagnosis yang akurat untuk deteksi HCV sangat diperlukan mengingat virus tersebut memiliki variasi genetik (heterogenitas) yang tinggi disertai distribusi yang berbeda-beda di setiap wilayah.^{6,7} Pada penelitian ini dilakukan pengembangan antigen rekombinan HCV berbasis epitop multipel untuk deteksi antibodi anti-HCV. Epitop target yang digunakan untuk menyusun antigen rekombinan HCV berasal dari protein core, NS3, NS4AB, NS4B, dan NS5A. Epitop yang digunakan tersebut adalah epitop yang bersifat imunodominan, lestari, serta dirancang dapat mewakili subtipe HCV yang bersirkulasi di Indonesia (1a, 1b, 1c, 2, 3) dan global.⁶ Hal ini dilakukan untuk meningkatkan efisiensi produksi antigen yang memiliki sensitivitas dan spesifisitas yang baik termasuk mengakomodasi berbagai subtipe HCV. Penelitian sebelumnya yang hanya mengakomodasi subtipe-subtipe HCV tertentu.¹¹⁻¹²

Gen penyandi antigen rekombinan HCV pada penelitian ini dibuat dengan teknik DNA sintetik setelah dilakukan proses optimasi kodon untuk sistem ekspresi *E. coli*. Keuntungan teknik ini yaitu dapat meningkatkan efisiensi perancangan DNA, adapun optimasi kodon dilakukan untuk meningkatkan efisiensi ekspresi protein pada sel inang yang digunakan.¹³ Pada beberapa penelitian sebelumnya, perancangan DNA dilakukan dengan RT-PCR.¹¹⁻¹² Pada penelitian ini gen penyandi antigen rekombinan HCV diterima dari perusahaan penyedia jasa sintesis DNA dalam bentuk telah terklona pada plasmid pUC57-HCV_ME. Gen sintetik tersebut selanjutnya dikonstruksi atau disubklona pada vektor ekspresi pQE80L.¹⁴ Plasmid pUC57 yang mengandung gen antigen rekombinan HCV ditransformasi pada sel kompeten *E. coli* Top10 untuk dipropagasi dan dikonfirmasi. Pembuatan sel kompeten dilakukan dengan prinsip sel bakteri

dilubangi menggunakan kalsium konsentrasi tinggi sehingga dapat menangkap DNA bebas dari luar sel. DNA dipakasa masuk ke dalam sel melalui lubang tersebut dengan adanya perubahan suhu yang mendadak. Plasmid pUC57 mengandung gen penyandi faktor resistensi ampisilin yang digunakan untuk seleksi sel transforman.¹⁵

Penyiapan DNA sisipan dan vektor ekspresi dilakukan melalui pemotongan plasmid pUC57-HCV_ME dan plasmid pQE80L dengan enzim BamHI dan HindIII. Pemotongan plasmid pUC57-HCV_ME bertujuan untuk memisahkan DNA sisipan antigen rekombinan HCV (1200 pb) dari kerangka plasmid pUC57 (2710 pb). Adapun pemotongan plasmid pQE80L bertujuan menyiapkan plasmid tersebut sehingga dapat disisipi oleh DNA antigen rekombinan HCV. Pemotongan enzim BamHI dan HindIII pada plasmid pQE80L membuat plasmid tersebut terlinierisasi dari awalnya berbentuk sirkuler. Ukuran plasmid pQE80L sebelum dipotong oleh enzim restriksi (BamHI dan HindIII) yaitu 4751 pb (berbentuk sirkuler), kemudian setelah dipotong (terlinierisasi) menjadi 4709 pb (tereduksi sebanyak 42 pb). Enzim BamHI memotong plasmid pada situs GGATCC di ujung 5', sedangkan enzim HindIII memotong pada situs AAGCTT di ujung 3'. Kedua enzim restriksi tersebut menghasilkan pola pemotongan ujung lancip (*sticky end*). Hal ini membantu proses ligasi antara DNA sisipan dengan vektor ekspresi menjadi lebih efisien karena ujung lancip yang bebas dari hasil pemotongan enzim restriksi dapat saling berpasangan dengan komplemen ujung lancip lain melalui ikatan hidrogen.¹⁶

Purifikasi hasil restriksi plasmid pUC57-HCV_ME dan pQE80L dilakukan dengan pemisahan pada *low melting agarose* (LMA) dan dilanjutkan dengan tahapan *desalting* sesuai prosedur QiaexII (Qiagen). Prinsip LMA adalah memisahkan fragmen DNA berdasarkan kecepatan migrasi dalam arus listrik yang dipengaruhi oleh ukuran DNA tersebut. DNA berukuran lebih besar memiliki jarak migrasi lebih dekat dibandingkan DNA berukuran kecil. Berdasarkan hal ini fragmen DNA target dapat terpisah dari fragmen DNA non-target. Prinsip *desalting* dengan QiaexII didasarkan pada kemampuan DNA untuk berikatan dengan partikel silika, kemudian garam dan protein kontaminan akan terbuang pada saat pencucian.^{17,18}

Ligasi antara DNA sisipan antigen

rekombinan HCV dengan plasmid pQE80L terjadi berdasarkan pembentukan ikatan fosfodiester dan ikatan hidrogen pada ujung *sticky end* yang saling berkomplementasi dari masing-masing DNA.¹⁹ Hasil ligasi ini menghasilkan plasmid pQE80L-HCV_ME yang kemudian ditransformasi pada *E. coli* Top10 untuk dipropagasi dan diverifikasi. Jumlah koloni *E. coli* Top10 yang tumbuh dari hasil transformasi plasmid pQE80L-HCV_ME (Tabel 1) sekitar 48 kali lebih banyak dibandingkan kontrol ligasi, hal ini dapat menunjukkan adanya keberhasilan reaksi ligasi. Kemudian adanya koloni yang tumbuh dari kontrol ligasi kemungkinan menunjukkan terdapat vektor yang belum terpotong. Selanjutnya adanya koloni yang tumbuh pada kontrol positif transformasi dan tidak terdapat koloni yang tumbuh pada kontrol negatif juga dapat menunjukkan keberhasilan transformasi dan pembuatan sel kompeten, termasuk dalam hal ini menunjukkan tidak adanya kontaminasi.

PCR koloni dengan primer pQE *forward* dan pQE *reverse* mengamplifikasi DNA sisipan antigen rekombinan HCV yang diapit oleh situs pengklonaan BamHI dan HindIII. Dari amplifikasi ini dihasilkan pita DNA berukuran 1450 pb yang merupakan gabungan dari DNA sisipan berukuran 1200 pb ditambah DNA dari plasmid 250 pb. Dengan demikian apabila pada plasmid pQE80L tidak terdapat DNA sisipan antigen rekombinan HCV, maka pita DNA yang dihasilkan yaitu 250 pb (seperti ditunjukkan oleh koloni nomor 8 dan lajur 11 Gambar 5). Berdasarkan analisis restriksi (koloni nomor 1-5 yang positif dari hasil PCR), plasmid pQE80L-HCV_ME berukuran sesuai dengan yang diharapkan (5909 pb). Ukuran ini adalah gabungan antara DNA sisipan antigen rekombinan HCV (1200 pb) dan plasmid pQE80L (4709 pb) (Gambar 6).

Analisis sekuensing dilakukan dengan cara melakukan *alignment* antara DNA sampel (plasmid hasil isolasi dari koloni nomor 1 yang positif berdasarkan PCR dan analisis restriksi) dengan DNA referensi (susunan DNA penyandi antigen rekombinan HCV yang dibuat gen sintetik). *Alignment* dilakukan menggunakan piranti lunak *mega software*. Hasilnya DNA yang dianalisis sesuai dengan DNA referensi yaitu sebagai gen penyandi antigen rekombinan HCV. Selain tidak terdapat mutasi, gen tersebut juga berada pada *open reading frame* yang sesuai pada plasmid pQE80L.

KESIMPULAN

Plasmid pQE80L-HCV_ME pengeksresi antigen rekombinan HCV berbasis epitop multipel telah berhasil dikonstruksi dan terverifikasi melalui uji PCR, analisis restriksi, dan sekuensing.

SARAN

Selanjutnya plasmid pQE80L-HCV_ME yang telah berhasil dikonstruksi pada penelitian ini ke depan dapat digunakan untuk memproduksi antigen rekombinan HCV yang dimanfaatkan untuk deteksi antibodi anti-HCV. Antigen rekombinan tersebut dapat diekspresikan pada sel prokariot seperti pada *E. coli* BL21, kemudian dipurifikasi dengan kromatografi afinitas dengan memanfaatkan *polihistidin* yang ada pada vektor ekspresi.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih penulis sampaikan kepada dr. Fera Ibrahim, M.Sc., Ph.D., Sp.MK(K) selaku pimpinan laboratorium PRVKP FKUI-RSCM, kemudian kepada para staf peneliti dan juga rekan-rekan di laboratorium tempat penulis mengerjakan penelitian. Terima kasih pula penulis sampaikan kepada PRVKP FKUI-RSCM yang telah mendanai penelitian ini.

DAFTAR PUSATAKA

1. Suzuki T, Ishii K, Aizaki H, Wakita T. Hepatitis C viral life cycle. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2007;57:1200-1212.
2. Kanda T, Yokosuka O, Omata M. Hepatitis C virus and hepatocellular carcinoma. *Biology*. 2013;2:304-316.
3. Dubuisson J, Cosset F. Virology and cell biology of the hepatitis C virus life cycle. *Journal of Hepatology*. 2014;61:3-13.
4. Chen SL, Morgan TR. 2006. The natural history of hepatitis C virus (HCV) infection. *J. Med. Sci*. 2006;3:47-52.
5. Zein NN. Clinical significance of hepatitis C virus genotypes. *Journal of Clinical Microbiology*. 2000;13(2):223-235.
6. Bukh J. The history of hepatitis C virus (HCV): basic research reveals unique feature in phylogeny, evolution and the viral life cycle with new perspective for epidemic control. *Journal of Hepatology*. 2016;65:2-21.
7. Li Hui-Chun, Lo Shih-Yen. Hepatitis C virus: virology, diagnosis and treatment. *World Journal of Hepatology*. 2015;7(10):1377-1389.

8. Richter SS. Laboratory assays for diagnosis and management of hepatitis C virus infection. *Journal of Clinical Microbiology*. 2002;40(12):4407-4412.
9. Galdino AS *et al.* A novel structurally stable multiepitope protein for detection of HCV. *Hepatitis Research and Treatment*. 2016;1-9.
10. PRVKP FKUI-RSCM. Protokol pembuatan DNA rekombinan. Jakarta: Universitas Indonesia; 2013.
11. Ali A, Nisar M, Idrees M, Rafique S, Iqbal M. Expression of hepatitis C virus core and E2 antigenic recombinant proteins and their use for development of diagnostic assays. *International Journal of Infectious Diseases*. 2015;34:84-89.
12. Dipti CA, Jain SK, Navin K. A novel recombinant multiepitope protein as a hepatitis C diagnostic intermediate of high sensitivity and specificity. *Protein Expression and Purification*. 2006;47:319-328.
13. Villalobos A, Ness JE, Gustafsson C, Minshall J, Govindarajan S. Gene designer: a synthetic biology tool for constructing artificial DNA segments. *Biomed Central*. 2006;7:1-8.
14. Qiagen. The QIAexpressionist: A handbook for high-level expression and purification of 6x-histagged proteins 5th ed. UDA: Qiagen; 2003.
15. Zhiming Tu *et al.* An improved system for competent cell preparation and high efficiency plasmid transformation using different *Escherichia coli* strains. *Electronic Journal of Biotechnology*. 8(1):114-120.
16. Brown T. Gene cloning & DNA analysis an introduction. 6th ed. Oxford: Wiley-Blackwell; 2010.
17. Qiagen. QIAEXII Handbook for DNA extraction from agarose and polyacrilamide gels and for desalting and concentrating DNA from solutions. Qiagen; 2015.
18. Sambrook J, Russell DW. *Molecular cloning: A laboratory manual*. 1st-3rd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press. 2001.
19. Alberts B *et al.* *Molecular biology of the cell*. 5th ed. USA: Garland Science. 2008.