



UNIVERSITAS INDONESIA

**ANALISIS RESPON ANTIBODI SPESIFIK MPER Gp41 PADA
MENCIT BALB/c YANG DIIMUNISASI VAKSIN DNA HA-
MPER2 HIV-1**

SKRIPSI

**NURUL HASANAH
0806453661**

**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
PROGRAM STUDI FARMASI
DEPOK
JULI 2012**



UNIVERSITAS INDONESIA

**ANALISIS RESPON ANTIBODI SPESIFIK MPER Gp41 PADA
MENCIT BALB/c YANG DIIMUNISASI VAKSIN DNA HA-
MPER2 HIV-1**

SKRIPSI

**Diajukan sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar
Sarjana Farmasi**

**NURUL HASANAH
0806453661**

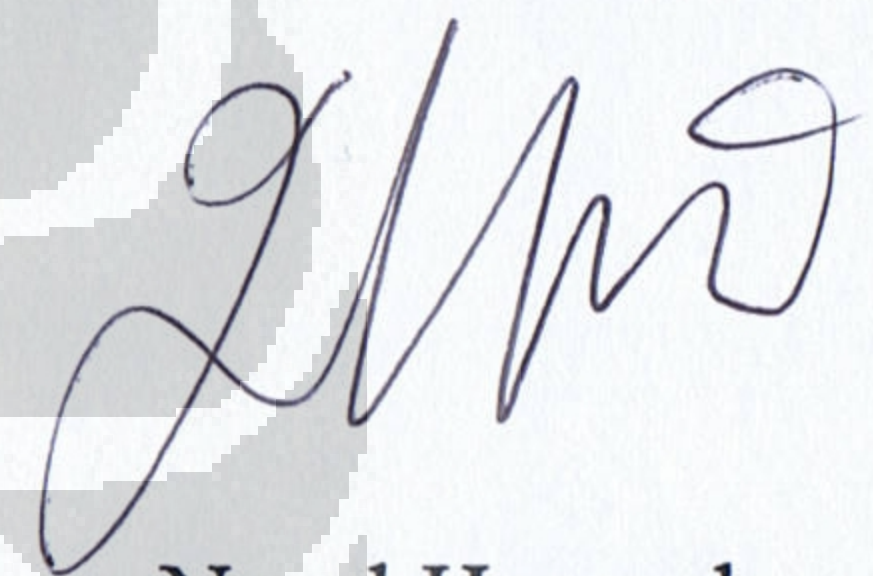
**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
PROGRAM STUDI FARMASI
DEPOK
JULI 2012**

SURAT PERNYATAAN BEBAS PLAGIARISME

Saya yang bertanda tangan di bawah ini dengan sebenarnya menyatakan bahwa skripsi ini saya susun tanpa tindakan plagiarisme sesuai dengan peraturan yang berlaku di Universitas Indonesia.

Jika di kemudian hari ternyata saya melakukan plagiarisme, saya akan bertanggung jawab sepenuhnya dan menerima sanksi yang dijatuhkan oleh Universitas Indonesia kepada saya.

Depok, 12 Juli 2012



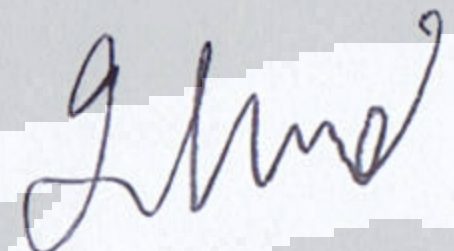
Nurul Hasanah

HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS

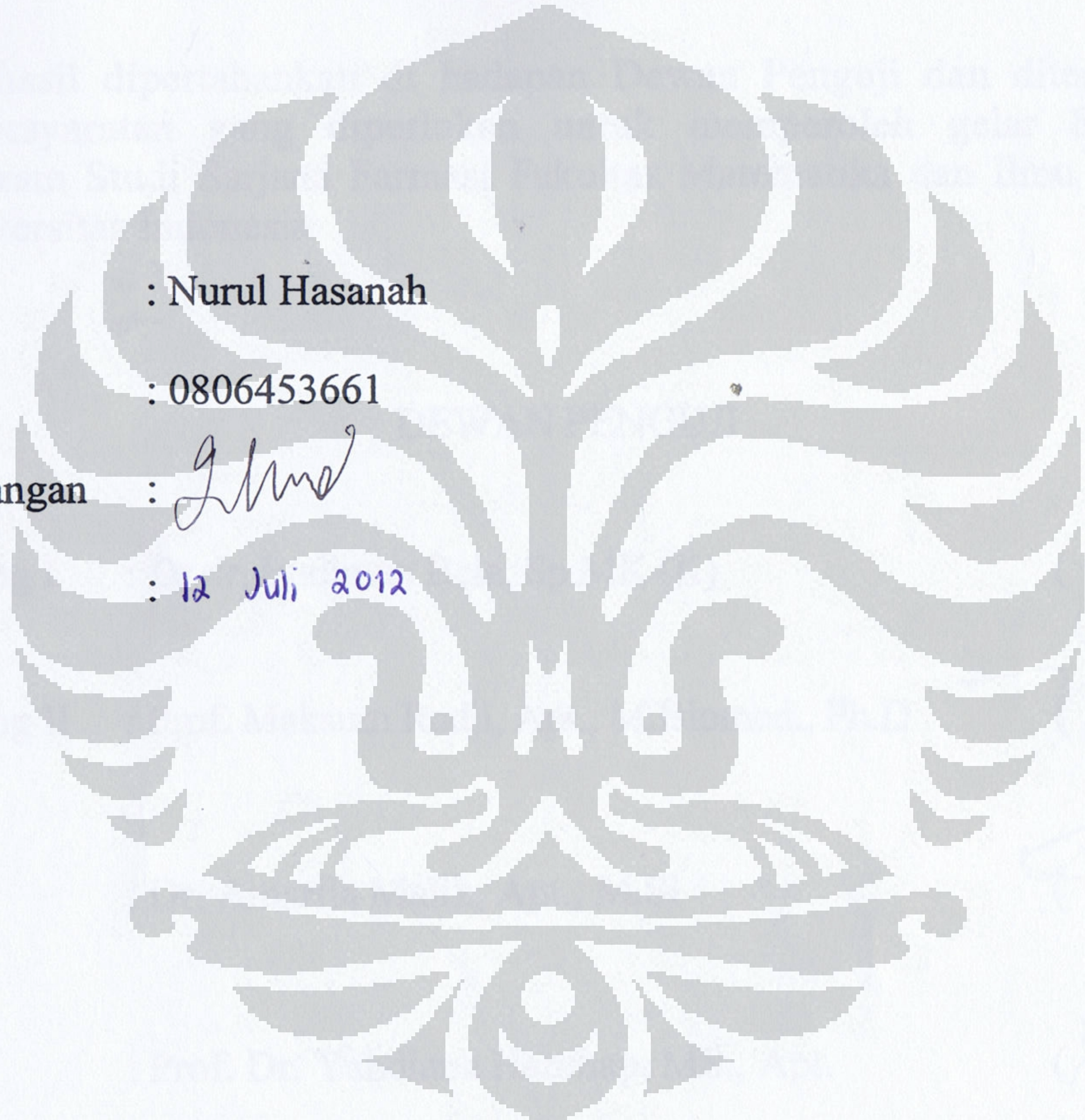
Skripsi ini adalah hasil karya saya sendiri, dan semua sumber baik yang dikutip maupun yang dirujuk telah saya nyatakan dengan benar.

Nama : Nurul Hasanah

NPM : 0806453661

Tanda Tangan : 

Tanggal : 12 Juli 2012



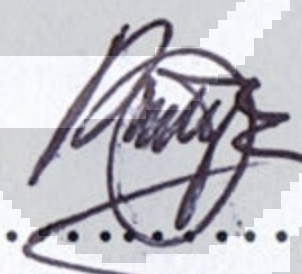
HALAMAN PENGESAHAN

Skripsi ini diajukan oleh :
Nama : Nurul Hasanah
NPM : 0806453661
Program Studi : Farmasi
Judul Skripsi : Analisis Respon Antibodi Spesifik MPER Gp41
pada Mencit BALB/c yang Diimunisasi Vaksin
DNA HA-MPER2 HIV-1

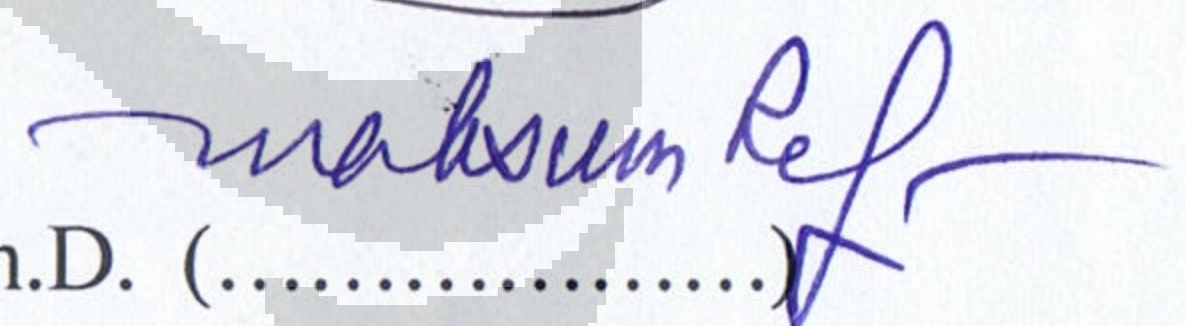
Telah berhasil dipertahankan di hadapan Dewan Penguji dan diterima sebagai bagian persyaratan yang diperlukan untuk memperoleh gelar Sarjana Farmasi pada Program Studi Farmasi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Indonesia

DEWAN PENGUJI

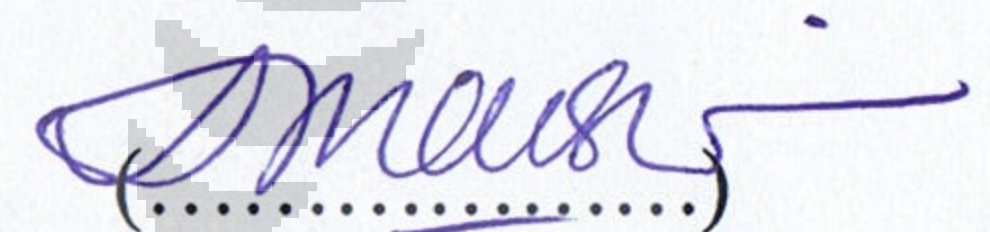
Pembimbing I : Dr. dr. Budiman Bela, Sp.MK(K)

()

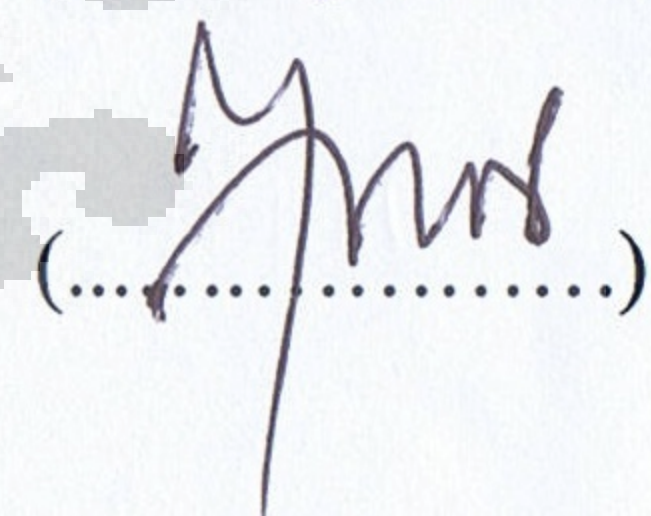
Pembimbing II : Prof. Maksum Radji, Apt., M.Biomed., Ph.D.

()

Penguji I : Dr. Amarila Malik, Apt., M.Si.

()

Penguji II : Prof. Dr. Yahdiana Harahap, Apt., M.S.

()

Ditetapkan di : Depok
Tanggal : 12 Juli 2012

KATA PENGANTAR

Puji syukur saya panjatkan kepada Allah SWT atas segala limpahan berkat dan rahmat-Nya yang tiada batas hingga saya dapat menyelesaikan skripsi ini. Penulisan skripsi ini dilakukan untuk memenuhi salah satu syarat dalam mencapai gelar Sarjana Farmasi di Universitas Indonesia. Saya menyadari bahwa, tanpa bantuan dan bimbingan dari berbagai pihak, sangatlah sulit bagi saya untuk menyelesaikan skripsi ini. Oleh karena itu, saya mengucapkan terima kasih kepada:

- (1) Prof. Dr. Yahdiana Harahap, MS., Apt. sebagai Ketua Departemen Farmasi Universitas Indonesia;
- (2) Dr. dr. Budiman Bela, Sp.MK(K) dan Prof. Maksum Radji, M.Biomed, Ph.D., Apt. sebagai dosen pembimbing yang telah menyediakan waktu, tenaga, dan pikiran untuk mengarahkan saya dalam penyusunan skripsi ini;
- (3) dr. R. Fera Ibrahim M.Sc., Ph.D., SpMK sebagai Kepala Laboratorium IHVCB-UI;
- (4) Dr. Herman Suryadi, M.S., Apt. sebagai pembimbing akademis selama masa perkuliahan di Farmasi;
- (5) Dr. Amarila Malik, M.Si atas bantuan hingga saya dapat melakukan penelitian ini di IHVCB-UI;
- (6) drh. Silvia Tri Widyaningtyas, Dr. Aroem Naroeni, dan para staf IHVCB atas segala bimbingan dan bantuan selama proses penelitian;
- (7) Orang tua dan keluarga saya yang telah memberikan bantuan dukungan material dan moral;
- (8) Winie Karunia Rahmani, Nada Fitria, dr. Ratna, Tris, Michelle dan Rudy sebagai rekan penelitian; serta segenap civitas akademika Farmasi Universitas Indonesia yang telah banyak membantu saya selama masa perkuliahan hingga proses penyelesaian skripsi ini.

Akhir kata, saya berharap Allah SWT berkenan membalas segala kebaikan semua pihak yang telah membantu. Semoga skripsi ini membawa manfaat bagi pengembangan ilmu.

Penulis

2012

HALAMAN PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI TUGAS AKHIR UNTUK KEPENTINGAN AKADEMIS

Sebagai sivitas akademik Universitas Indonesia, saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Nurul Hasanah
NPM : 0806453661
Program Studi : Sarjana Farmasi
Departemen : Farmasi
Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Jenis Karya : Skripsi

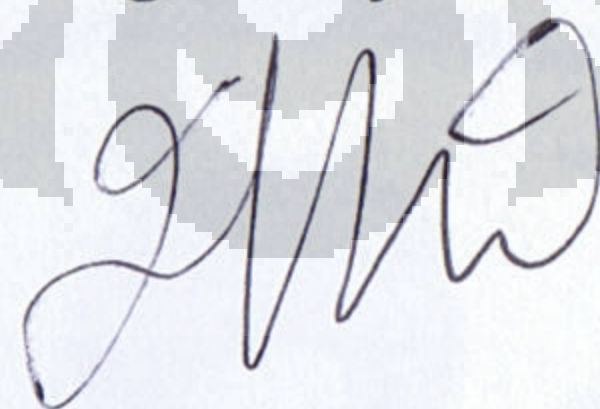
demi pengembangan ilmu pengetahuan, menyetujui untuk memberikan kepada Universitas Indonesia Hak Bebas Royalti Noneksklusif (*Non-exclusive Royalty Free Right*) atas karya ilmiah saya yang berjudul :

Analisis Respon Antibodi Spesifik MPER gp41 pada Mencit Balb/C yang Diimunisasi Vaksin DNA HA-MPER2 HIV-1.

Dengan Hak Bebas Royalti Noneksklusif ini Universitas Indonesia berhak menyimpan, mengalihmedia/formatkan, mengelola dalam bentuk pangkalan data (database), merawat, memublikasikan tugas akhir saya selama tetap mencantumkan nama saya sebagai penulis/pencipta dan sebagai pemilik Hak Cipta.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya.

Dibuat di : Depok
Pada tanggal : 12 Juli 2012
Yang menyatakan



(Nurul Hasanah)

ABSTRAK

Nama : Nurul Hasanah
Program Studi : Farmasi
Judul : Analisis Respon Antibodi MPER Gp41 HIV-1 pada Mencit BALB/c yang Diimmunisasi Vaksin DNA HA-MPER2 HIV-1

Masih tingginya prevalensi infeksi HIV di Indonesia dan anjuran WHO untuk melakukan pengembangan vaksin HIV-1 dalam penanganan penyebaran infeksi, menjadikan pentingnya dilakukan pengembangan vaksin HIV untuk tujuan preventif maupun kuratif HIV-1 berdasarkan subtype AE_CRF01 isolat Indonesia. MPER gp41 sebagai salah satu target dalam pengembangan vaksin HIV telah diketahui dapat menginduksi produksi antibodi netralisasi HIV terhadap MPER-gp41. Namun dalam implementasinya, MPER memiliki imunogenisitas yang rendah. Pada penelitian terdahulu telah berhasil dibuat vaksin DNA HA-MPER2 yang mengandung gen HA H5N1 sebagai antigen yang akan mempresentasikan epitop MPER gp41 HIV-1. Penelitian ini dilakukan untuk membuktikan adanya respon antibodi spesifik MPER gp41 HIV-1 pada mencit BALB/c yang diimmunisasi vaksin DNA HA-MPER2, kemudian dibandingkan dengan kelompok mencit yang diimmunisasi vaksin DNA HA-MPER1, vaksin DNA HA dan vaksin DNA *wildtype*. Penelitian diawali dengan membuat sel *E. coli* TOP 10 kompeten, transformasi plasmid rekombinan, verifikasi hasil isolasi plasmid dengan analisa gel agarosa 0,8% dan sekuensing. Kemudian dilakukan preparasi vaksin DNA sebelum penyuntikan dengan dilarutkannya plasmid dalam PBS 1x dan ditambahkan DMRIE-c (perbandingan molar 1:2). Pengujian ELISA dilakukan terhadap serum antibodi (pengenceran 1/50) dengan menggunakan peptida ELDKWAS 12,5 µg/ml sebagai antigen. Hasil uji ELISA menunjukkan adanya respon antibodi spesifik terhadap MPER gp41 HIV-1 dengan titer antibodi dalam jumlah rendah.

Kata Kunci : HIV-1, vaksin DNA, MPER gp41, mencit BALB/c, ELDKWAS peptide, antibodi spesifik, ELISA
xiv + 99 halaman: 22 gambar; 11 lampiran
Daftar Acuan : 62 (1979-2012)

ABSTRACT

Name : Nurul Hasanah
Study Program : Pharmacy
Title : Analysis of Antibodies Response MPER Gp41 HIV-1 in BALB/c Immunized DNA Vaccine HA-MPER2 HIV-1

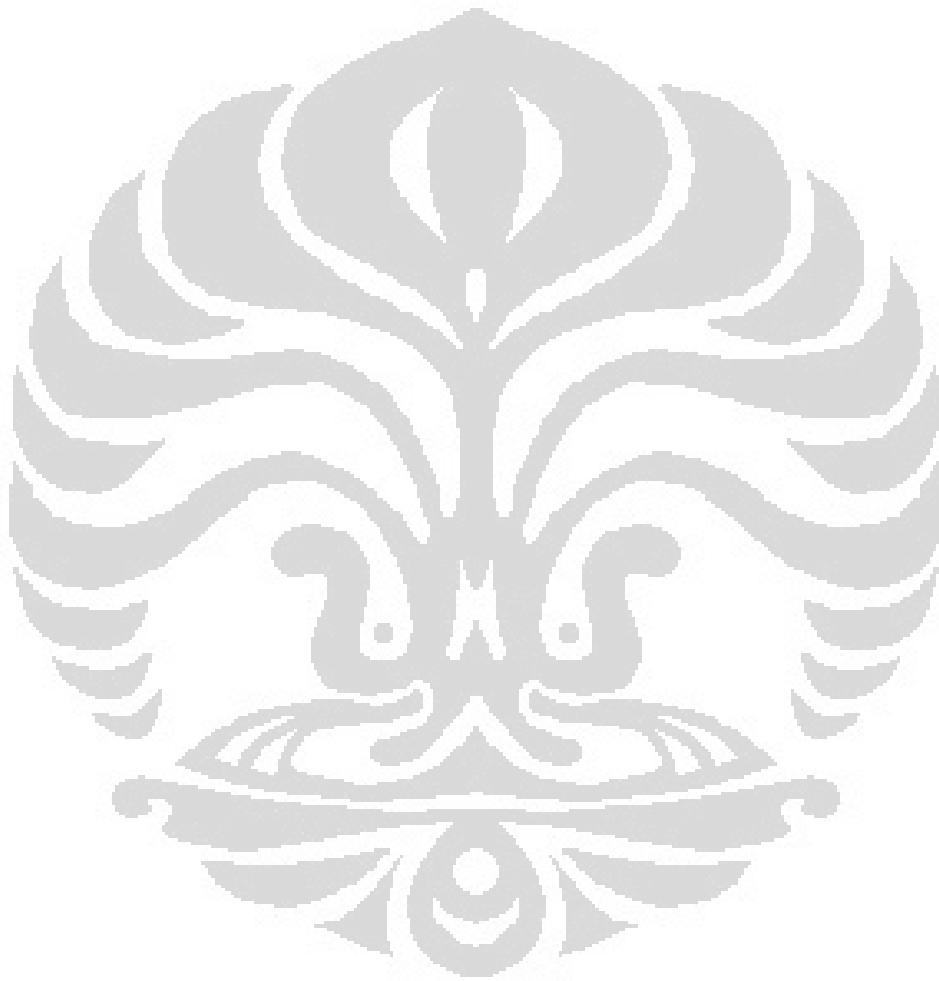
The high prevalence of HIV infection in Indonesia and WHO recommendation to develop HIV-1 vaccine in the handling of infection spreading signifies the importance of HIV-1 vaccine development for preventive and curative purpose based on AE_CRF01 subtype of Indonesian isolate. MPER gp41 as one of the target of HIV vaccine development had been known to induce production of neutralizing antibody against HIV MPER gp41. However, in the implementation, MPER had low immunogenicity. Previous work on HIV vaccine development at IHVCB-UI had successfully produced DNA HA-MPER2 vaccine prototype which contained HA H5N1 gen as a scaffold that would present MPER gp41 HIV-1 epitope. This research was conducted to prove the existence of specific antibody response towards HIV MPER gp41 in BALB/c mice immunized by HA-MPER2 DNA vaccine in comparison with BALB/c mice immunized by HA DNA vaccine and the pcDNA3.1 vector DNA. The research was initiated by generation of *E. coli* TOP 10 competent cells, followed by transformation of competent cells, and plasmid isolation. The result would be verified by 0.8% agarosa gel analysis and sequencing, followed by DNA vaccine preparation by dissolving plasmid in PBS 1x and adding DMRIE-c (molar comparison 1:2). The ELISA test was conducted towards antibody serum (dilution 1/50) by using 12.5 µg/ml ELDKWAS peptide as an antigen. The result showed the presence of specific antibody response towards HIV MPER (ELDKWAS) gp41 that was observed in low titer.

Key Words : HIV-1, DNA vaccine, MPER gp41, BALB/c mice, ELDKWAS peptide, specific antibody, ELISA
xiv + 99 pages : 22 pictures; 11 appendices
Bibliography : 62 (1979-2012)

DAFTAR ISI

HALAMAN SAMPUL	i
HALAMAN JUDUL	ii
PERNYATAAN BEBAS PLAGIARISME	iii
HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS	iv
HALAMAN PENGESAHAN	v
KATA PENGANTAR	vi
PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI	vii
ABSTRAK	viii
ABSTRACT	ix
DAFTAR ISI	x
DAFTAR GAMBAR	xii
DAFTAR LAMPIRAN	xiv
BAB 1. PENDAHULUAN	1
1.1. Latar Belakang	1
1.2. Tujuan Penelitian	4
1.3. Manfaat Penelitian	4
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA	5
2.1. HIV	5
2.2. Hemaglutinin Virus Influenza H5N1	14
2.3. Antigen, Imunogen dan Antibodi	16
2.4. Vaksin	19
2.5. MPER gp41 HIV-1	23
2.6. Plasmid	24
2.7. Elektroforesis	28
2.8. Uji Serologis	29
BAB 3. METODE PENELITIAN	31
3.1. Metode Umum Penelitian	31
3.2. Lokasi dan Waktu Penelitian	33
3.3. Alat	34
3.4. Bahan	34
3.5. Cara Kerja	36
BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN	50
4.1. Pembuatan Sel Bakteri Kompeten dan Transformasi	50
4.2. Isolasi Plasmid Skala Kecil	52
4.3. Sekuensing	57
4.4. Isolasi Plasmid Skala Besar	57
4.5. Preparasi Vaksin dan Imunisasi	59
4.6. Uji Serologis	60

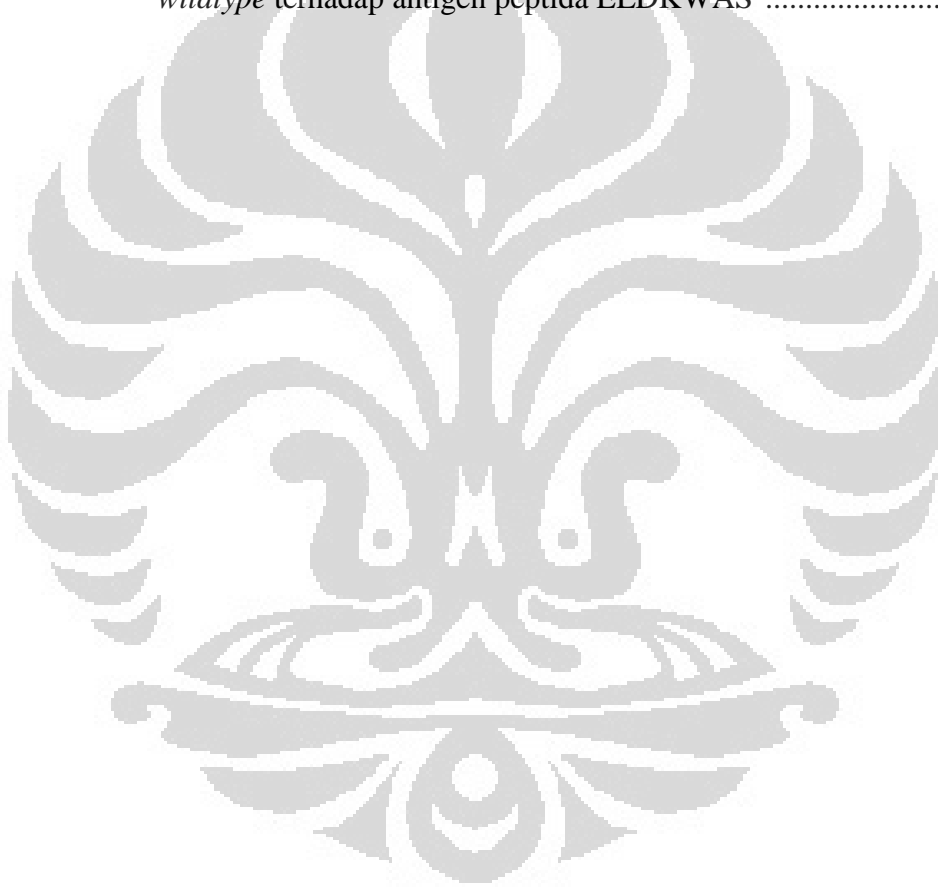
BAB 5. SARAN DAN KESIMPULAN	73
5.1. Kesimpulan	73
5.2. Saran	73
DAFTAR ACUAN	74
LAMPIRAN	80



DAFTAR GAMBAR

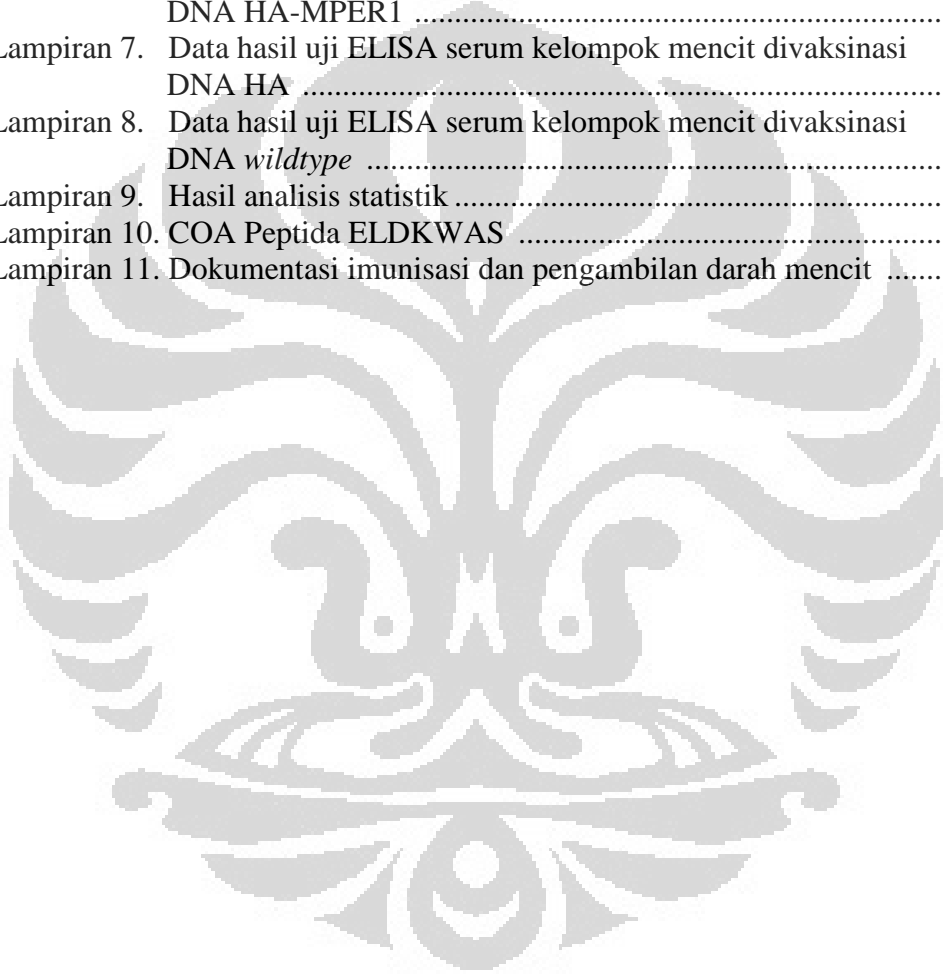
Gambar 2.1	Perbedaan genom HIV-1 dan HIV-2	6
Gambar 2.2	Genom HIV-1 (A) dan Struktur anatomi HIV-1 (B)	8
Gambar 2.3	Siklus replikasi HIV	12
Gambar 2.4	Struktur virus influenza.....	15
Gambar 2.5	Struktur dasar imunoglobulin	19
Gambar 2.6	Skema domain pada gp41	23
Gambar 2.7	Proses lisis dibawah kondisi alkali	26
Gambar 2.8	Bagan vektor ekspresi pcDNA3.1(+)	28
Gambar 3.1	Rancangan alur penelitian	32
Gambar 3.2	Bagan imunisasi mencit	33
Gambar 3.3	Proses kompeten dan transformasi plasmid ke dalam sel bakteri	40
Gambar 3.4	Bagan cara kerja transformasi pcDNA3.1(+), pcDNA3.1HA dan pcDNA3.1HA-MPER2 ke dalam bakteri <i>E. coli</i> TOP 10...	41
Gambar 4.1	Hasil transformasi plasmid rekombinan ke dalam sel <i>E. coli</i> TOP 10	51
Gambar 4.2	Hasil isolasi plasmid pcDNA3.1(+), pcDNA3.1HA dan pcDNA3.1HA-MPER2	54
Gambar 4.3	Hasil isolasi plasmid pcDNA3.1(+), pcDNA3.1HA	55
Gambar 4.4	Hasil restriksi plasmid pcDNA3.1(+), pcDNA3.1HA dan pcDNA3.1HA-MPER2 dengan enzim <i>BamHI</i>	56
Gambar 4.5	Hasil restriksi plasmid pcDNA3.1(+), pcDNA3.1HA dan pcDNA3.1HA-MPER2 dengan enzim <i>HindIII</i>	58
Gambar 4.6	Peta ELISA ketika optimasi peptida ELDKWAS	80
Gambar 4.7	Reaktivitas serum ke-4 dan serum ke-1 campuran semua mencit kelompok HA-MPER2 pada beberapa pengenceran terhadap peptida ELDKWAS 15 µg/ml	81
Gambar 4.8	Reaktivitas serum ke-4 dan serum ke-1 campuran semua mencit kelompok HA-MPER2 pada beberapa pengenceran terhadap peptida ELDKWAS 12,5 µg/ml	81
Gambar 4.9	Reaktivitas serum ke-4 dan serum ke-1 campuran semua mencit kelompok HA-MPER2 pada beberapa pengenceran terhadap peptida ELDKWAS 10 µg/ml	82
Gambar 4.10	Reaktivitas serum ke-4 dan serum ke-1 campuran semua mencit kelompok HA-MPER2 pada beberapa pengenceran terhadap peptida ELDKWAS 7,5 µg/ml	82
Gambar 4.11	Peta ELISA ketika optimasi pengenceran serum	83
Gambar 4.12	Grafik respon antibodi beberapa pengenceran serum terhadap peptida ELDKWAS 12,5 µg/ml	84
Gambar 4.13	Peta ELISA saat pengujian kontrol negatif	85
Gambar 4.14	Grafik yang menggambarkan hasil ELISA pada pengujian kontrol negatif	86
Gambar 4.15	Reaktivitas serum mencit divaksinasi vaksin DNA HA-MPER2 terhadap antigen peptida ELDKWAS	64

Gambar 4.16 Reaktivitas rata-rata serum mencit divaksinasi vaksin DNA HA-MPER2 terhadap antigen peptida ELDKWAS	64
Gambar 4.17 Reaktivitas serum mencit divaksinasi vaksin DNA HA-MPER1 terhadap antigen peptida ELDKWAS	65
Gambar 4.18 Reaktivitas rata-rata serum mencit divaksinasi vaksin DNA HA-MPER1 terhadap antigen peptida ELDKWAS	66
Gambar 4.19 Reaktivitas serum mencit divaksinasi vaksin DNA HA terhadap antigen peptida ELDKWAS	67
Gambar 4.20 Reaktivitas rata-rata serum mencit divaksinasi vaksin DNA HA terhadap antigen peptida ELDKWAS	68
Gambar 4.21 Reaktivitas serum mencit divaksinasi vaksin DNA <i>wildtype</i> terhadap antigen peptida ELDKWAS	69
Gambar 4.22 Reaktivitas rata-rata serum mencit divaksinasi vaksin DNA <i>wildtype</i> terhadap antigen peptida ELDKWAS	69



DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1.	Optimasi konsentrasi peptida ELDKWAS sebagai antigen	80
Lampiran 2.	Optimasi pengenceran serum untuk uji ELISA	83
Lampiran 3.	Uji ELISA pada kontrol negatif	85
Lampiran 4.	Hasil optimasi larutan <i>blocking</i> dan larutan pengencer untuk uji ELISA	87
Lampiran 5.	Data hasil uji ELISA serum kelompok mencit divaksinasi DNA HA-MPER2	88
Lampiran 6.	Data hasil uji ELISA serum kelompok mencit divaksinasi DNA HA-MPER1	89
Lampiran 7.	Data hasil uji ELISA serum kelompok mencit divaksinasi DNA HA	90
Lampiran 8.	Data hasil uji ELISA serum kelompok mencit divaksinasi DNA <i>wildtype</i>	91
Lampiran 9.	Hasil analisis statistik	92
Lampiran 10.	COA Peptida ELDKWAS	98
Lampiran 11.	Dokumentasi imunisasi dan pengambilan darah mencit	99



BAB 1

PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

HIV/AIDS merupakan suatu penyakit infeksi yang menjadi pusat perhatian dan memiliki dampak yang signifikan bagi umat manusia di seluruh dunia. Berdasarkan *Progress report 2011: Global HIV/AIDS response* (WHO, 2011) hingga akhir 2010 diperkirakan 34 juta orang di seluruh dunia terinfeksi HIV. Awal epidemi di Indonesia terjadi pada tahun 1987, saat ditemukannya kasus pertama AIDS di Provinsi Bali (Komisi Penanggulangan AIDS Nasional, 2011). Sejak saat itu hingga Maret 2012, kasus HIV-AIDS tersebar di 368 dari 498 kabupaten/kota di seluruh provinsi Indonesia. Menurut laporan perkembangan HIV-AIDS di Indonesia pada Triwulan I tahun 2012 yang dikeluarkan oleh Direktorat Jenderal Pengendalian Penyakit dan Penyehatan Lingkungan Kementerian Kesehatan RI, jumlah kumulatif kasus HIV dan AIDS hingga Maret 2012 berturut-turut tercatat sebanyak 82.870 kasus dan 30.430 kasus (Dirjen P2PL Kemenkes RI, 2012). Pada data terbaru hasil STBP (Survei Surveilans Terpadu Biologis dan Perilaku) yang dilaksanakan di 22 kabupaten/kota pada 11 provinsi terdapat temuan penting yaitu masih tingginya prevalensi HIV pada kelompok risiko tinggi tertular HIV di Indonesia (Dirjen P2PL Kemenkes RI, 2011).

Berbagai upaya dan strategi dilakukan oleh berbagai negara di dunia, untuk mengendalikan dan mengakhiri epidemi HIV/AIDS. Salah satu cara pengendalian epidemi HIV/AIDS dengan pengobatan ART telah banyak dilakukan, begitu juga di Indonesia. Namun pengobatan dengan ART tidak lantas mengobati secara menyeluruh orang yang terinfeksi HIV/AIDS. ART hanya dapat menekan replikasi virus pada level yang tidak terdeteksi, tetapi tidak dapat mengeradikasi HIV dari tubuh (Dong & Chen, 2006; National Institute of Allergy and Infectious Disease, 2011). Frekuensi pemberian obat yang rutin, adanya kemungkinan toksisitas, dan dapat terjadinya resistensi virus menjadi keterbatasan penggunaan ART lebih lanjut. Karena sampai saat ini belum ada penyembuhan

dari penyakit AIDS, pencegahan infeksi menjadi suatu langkah yang sangat dibutuhkan dalam usaha untuk mengontrol dan mengakhiri epidemi penyakit ini (Kim & Read, 2010).

WHO dalam *Global health sector strategy on HIV/AIDS 2011-2015* (2011) mendukung upaya pengembangan pembuatan vaksin sebagai salah satu intervensi baru dalam pencegahan HIV/AIDS. Vaksin HIV yang memiliki khasiat, keamanan dan keefektifan yang tinggi diharapkan dapat menjadi strategi terbaik dalam pengendalian epidemi HIV secara global. Pengujian pertama kali kandidat vaksin HIV yang diujicobakan pada manusia pernah dilakukan pada tahun 1987 di USA. Hingga kini upaya pengembangan vaksin HIV semakin meningkat di berbagai negara di dunia dan terdapat berbagai kandidat vaksin yang sedang atau telah berada pada tahap percobaan klinis pada manusia (Esparza, 2001).

Masih tingginya prevalensi infeksi HIV di Indonesia (Pusat Komunikasi Publik, Sekjen Kemenkes RI, 2011) dan anjuran WHO untuk melakukan pengembangan vaksin HIV-1 dalam penanganan penyebaran infeksi menjadikan pentingnya penelitian ini dilakukan. Pengembangan vaksin HIV-1 produksi Indonesia menjadi sangat penting ketika banyaknya sub tipe HIV-1 yang berbeda menjadi penyebab epidemi di berbagai negara di dunia. Terlebih hingga saat ini belum ada vaksin yang efektif terhadap semua sub tipe dari HIV (Klatt, 2011). Usaha dalam penanganan epidemi yang mandiri semacam ini juga menjadi lebih efektif dan efisien jika dipandang dari sisi ekonomi. Laboratorium *Institute of Human Virology and Cancer Biology University of Indonesia* (IHVCB-UI) sedang berupaya dalam mengembangkan prototipe vaksin HIV-1 untuk tujuan preventif maupun kuratif, berdasarkan sub tipe AE_CRF01 isolat Indonesia. Berdasarkan studi epidemiologi yang dilakukan oleh Sahbandar et al. (2009), sub tipe AE_CRF01 merupakan sub tipe yang paling banyak dijumpai dengan presentase 90,7% dari 75 responden di beberapa daerah di Indonesia (Bali dan Jawa) dan 96.2% dari 208 responden di Provinsi DKI Jakarta.

Berbagai alternatif digunakan untuk pembuatan vaksin HIV. Strategi pembuatan vaksin konvensional dengan melemahkan virus hidup atau inaktivasi virus utuh memiliki beberapa keterbatasan. Risiko dari vaksin yang dibuat dari virus yang dilemahkan yakni adanya kemungkinan terjadinya pengembalian

virulensi ataupun rekombinasi genetik intraseluler. Sedangkan risiko utama yang dihadapi dari vaksin virus utuh yang diinaktivasi adalah kesulitan dalam menentukan ketiadaan dari residu virus yang menginfeksi dalam produksi skala besar. Pengembangan vaksin saat ini telah difokuskan pada pendekatan baru yang dianggap lebih aman dan menjanjikan, diantaranya yaitu vaksin DNA.

Salah satu pendekatan dalam perkembangan penelitian vaksin DNA untuk HIV adalah imunisasi dengan injeksi langsung plasmid DNA yang mengandung gen pengkode protein spesifik HIV seperti gp41 (Klatt, 2011). Pada protein transmembran gp41 telah diketahui memiliki daerah eksternal dari membran proksimal, disebut MPER, yang dikenali oleh beberapa antibodi netralisasi manusia. Beberapa sekuens epitop netralisasi yang terkandung di dalam MPER telah berhasil dipetakan, diantaranya ELDKWAS. Sekuens tersebut dikenali oleh monoklonal antibodi netralisasi HIV-1, yaitu 2F5 (untuk ELDKWAS). Oleh karena itu, MPER dapat menjadi target dalam pengembangan vaksin HIV untuk dapat menginduksi produksi antibodi netralisasi HIV terhadap MPER-gp41 secara aktif dalam tubuh manusia. Namun, beberapa studi terdahulu menunjukkan bahwa MPER memiliki imunogenisitas yang rendah (Montero, van Houten, Wang, & Scott, 2008; Dong & Chen, 2006).

Terdapat beberapa metode yang mungkin efektif dalam meningkatkan imunogenisitas dari MPER, diantaranya yaitu pengembangan sisipan MPER pada suatu antigen virus lain yang memiliki imunogenisitas kuat dan modifikasi strategi pemberian imunisasi (seperti imunisasi *prime-boost*) (Montero, van Houten, Wang, & Scott, 2008; Dong & Chen, 2006). Pengembangan sisipan MPER pada suatu antigen virus lain pernah dilakukan pada studi terdahulu dengan digunakannya hemagglutinin virus influenza H1N1 untuk mempresentasikan epitop MPER (ELDKWAS) pada situs antigenik B, kemudian virus hidup digunakan sebagai komponen vaksin pada hewan coba. Hasil penelitian tersebut didapatkan antibodi spesifik terhadap MPER tetapi titer antibodi yang dihasilkan masih pada tahap sedang (Muster dkk, 1994).

Pada penelitian terdahulu telah dilakukan suatu pengembangan vaksin DNA dengan diinsersikannya beberapa sekuens MPER (ELDKWAS) dari gp41 virus HIV-1 pada situs antigenik B Hemagglutinin (HA) virus H5N1 kemudian gen

HA yang telah dimutasi tersebut diklonasi dalam vektor pcDNA3.1(+) dan ditransformasi ke dalam *E. Coli* TOP 10 (Agustian, 2012, *unpublish*). Hasil studi tersebut diharapkan mampu menginduksi respon imun yang lebih tinggi dibandingkan penelitian-penelitian sebelumnya. Pada penelitian lanjutan ini, akan dilakukan pengujian kemampuan plasmid rekombinan tersebut sebagai vaksin DNA dalam menginduksi respon antibodi spesifik MPER gp41 HIV-1 pada mencit BALB/c.

1.2. Tujuan Penelitian

1.2.1 Tujuan umum

Penelitian ini bertujuan untuk menilai respon antibodi spesifik terhadap MPER gp41 HIV-1 pada mencit BALB/c yang diimunisasi vaksin DNA HA-MPER2 HIV-1 (plasmid pcDNA3.1 HA-MPER2).

1.2.2 Tujuan khusus

1. Untuk mendapatkan plasmid pcDNA3.1HA-MPER2, plasmid pcDNA3.1HA, dan plasmid pcDNA3.1 (*wildtype*) dalam bentuk murni dengan jumlah yang mencukupi untuk imunisasi masing-masing 6 mencit BALB/c
2. Untuk mendapatkan serum mencit BALB/c yang diimunisasi dengan pcDNA3.1HA-MPER2, kontrol pcDNA3.1HA dan pcDNA3.1
3. Untuk mendapatkan perbandingan respon antibodi spesifik MPER gp41 HIV-1 pada populasi mencit BALB/c yang diimunisasi dengan pcDNA3.1HA-MPER2, kontrol pcDNA3.1HA dan pcDNA3.1

1.3. Manfaat Penelitian

Informasi yang diperoleh dari hasil penelitian ini untuk mendapatkan gambaran mengenai potensi pemanfaatan plasmid pcDNA3.1HA-MPER2 sebagai prototipe vaksin DNA penginduksi respon antibodi netralisasi HIV-1.

BAB 2

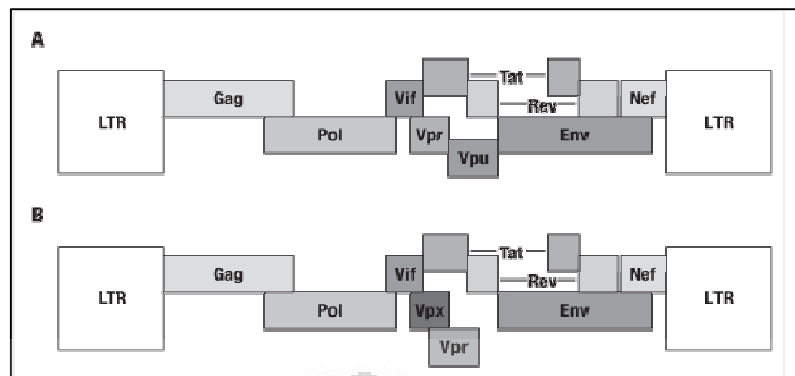
TINJAUAN PUSTAKA

2.1. HIV

Pada tahun 1983 telah diidentifikasi suatu virus yang merupakan etiologi AIDS, yakni *Human Immunodeficiency Virus* (HIV). HIV termasuk retrovirus dari genus lentivirus, subfamili Lentivirinae, famili Retroviridae (Girard, 1994; Sardjito, 1994). HIV merupakan virus RNA yang memiliki bentuk sferis dengan diameter 1/10.000 mm. Virus ini memiliki selubung dengan nukleokapsid yang berbentuk ikosahedral. Semua anggota famili Retroviridae, termasuk HIV, memiliki enzim *reverse transcriptase* (RT) yang berperan penting dalam pembentukan DNA virus dalam sel pejamu (Sardjito, 1994; National Institute of Allergy and Infectious Diseases, 2009).

Dikenal dua tipe HIV, HIV-1 dan HIV-2. Kedua tipe tersebut dapat menyebabkan AIDS, tetapi HIV-1 nampak lebih agresif dan menyebar luas dengan cepat sehingga epidemi HIV/AIDS secara global terutama disebabkan oleh HIV-1 (Merati & Djauzi, 2006: 272; Girard, 1994: 824; Bennett, 2011). Sedangkan HIV-2 hanya terdapat di Afrika Barat dan beberapa negara Eropa yang memiliki keterkaitan dengan Afrika Barat (Merati & Djauzi, 2006: 272; Belasio et al., 2010).

HIV-1 maupun HIV-2 memiliki kemiripan struktur pada genomnya, dapat dilihat pada Gambar 2.1. Perbedaan dari keduanya terdapat pada salah satu gen, dimana HIV-1 mempunyai gen *vpu* sedangkan HIV-2 mempunyai gen *vpx*. Walaupun perbedaan antar struktur genomnya sangat sedikit, diperkirakan memiliki peranan penting dalam patogenitas dan perjalanan penyakit diantara kedua tipe virus tersebut (Merati & Djauzi, 2006: 272).



[Sumber : Belasio et al., 2010, telah diolah kembali]

Keterangan : A. Genom HIV-1 yang mengandung gen *vpu*; B. Genom HIV-2 yang mengandung gen *vpx*.

Gambar 2.1 Perbedaan genom HIV-1 dan HIV-2

2.1.1. Struktur dan genom HIV-1

HIV memiliki tingkat mutasi yang tinggi, sehingga virus ini memiliki banyak strain yang berbeda. Strain HIV-1 diklasifikasikan menjadi empat grup: M (*major*), O (*Outlier*), N, dan P. Lebih dari 90 persen infeksi HIV-1 terjadi akibat HIV-1 grup M. Dalam HIV-1 grup M sendiri terdapat sepuluh sub tipe, diantaranya A, B, C, D, F, G, H, J, K, dan CRF (Avert, 2011; Requejo, 2006). Keragaman HIV dapat disebabkan oleh berbagai hal, diantaranya adanya kesalahan pembacaan sintesis DNA dari RNA oleh *reverse transcriptase*, frekuensi rekombinasi yang tinggi pada saat terjadinya proses transkripsi balik dan banyaknya individu yang terinfeksi (Fields, 2007).

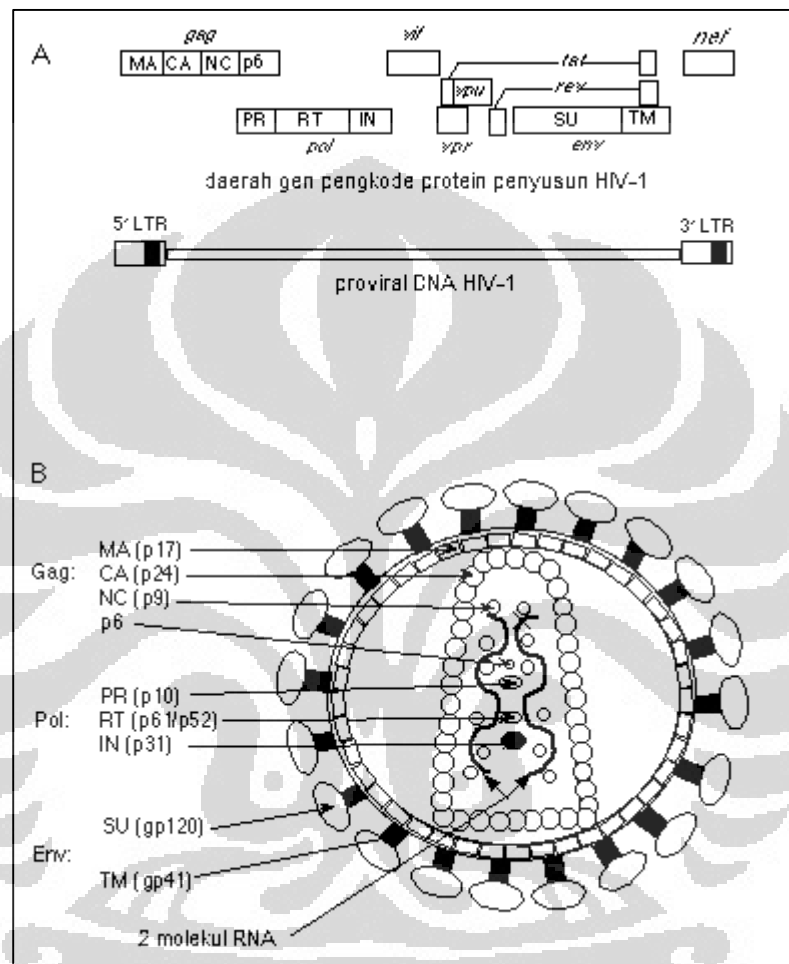
Pada morfologi HIV-1 terlihat adanya tonjolan pada permukaan sel yang merupakan membran lipid bilayer. Tonjolan pada permukaan sel merupakan oligomer-oligomer dari protein yang terlikosilasi, gp160. Glikoprotein pada permukaan sel tersebut terdiri dari glikoprotein transmembran dan glikoprotein eksternal. Glikoprotein transmembran yang tertanam pada membran lipid bilayer dan berperan dalam menjaga struktur oligomerik, yaitu gp41. Sementara itu, gp120 merupakan glikoprotein eksternal yang akan berikatan dengan reseptor CD4 pada permukaan sel pejamu (Sardjito, 1994; Girard, 1994). Banyak

penelitian untuk pengembangan vaksin HIV difokuskan pada protein-protein selubung ini (Girard, 1994).

Pada bagian dalam virion virus terdapat lapisan protein yang disusun dari 1200 molekul protein p24gag. Sedangkan pada bagian dalam inti terdapat dua kopi rantai tunggal RNA dengan panjang 9,5 kb, enzim *reverse transcriptase* (RT), dan protein internal seperti p6 dan p7gag (Girard, 1994; Hope & Trono, 2000). Rantai tunggal RNA HIV diapit oleh dua elemen pengatur yakni LTR (*Long Terminal Repeats*) yang mengandung promoter dan terminasi transkripsi, sinyal poliadenilasi, dan elemen pengatur lainnya yang mengontrol aktivitas promoter serta merespon secara spesifik ke protein pengatur dari sel pejamu (SP1, NFkB, PRD-II) atau dari virus (protein *tat*) (Girard, 1994: 824).

Pada Gambar 2.2 dapat dilihat adanya gen-gen pada HIV yang mengkode setidaknya sembilan protein dan dibagi menjadi tiga kelas yaitu protein struktural, *gag*, *pol* dan *env*; protein regulator, *tat* dan *rev*; dan protein aksesori, *vpu*, *vpr*, *vif* dan *nef* (Hope & Trono, 2000; Sardjito, 1994). Gen pengkode protein struktural seperti *gag* mengkode protein struktural inti (p24, p7 dan p6) dan matriks (p17); gen *env* mengkode selubung glikoprotein gp41 (protein transmembran) dan gp120 (protein ekstrasel) yang akan berikatan dengan reseptor permukaan sel pejamu; dan gen *pol* mengkode enzim-enzim yang penting untuk replikasi virus, yakni *reverse transcriptase* yang memungkinkan virus menyusun DNA melalui kode RNA, integrase yang menyisipkan DNA virus ke dalam DNA pejamu (hasilnya disebut provirus), dan protease yang memecah prekursor protein *gag* dan *pol*. Sedangkan gen pengkode protein regulator seperti *tat* berfungsi mengkode suatu protein transaktivasi transkripsi yang penting untuk replikasi HIV-1; gen *rev* mengkode suatu protein yang dibutuhkan untuk ekspresi gen struktural virus dengan menginduksi transisi dari fase awal hingga akhir dari proses ekspresi gen HIV. Untuk fungsi protein aksesori HIV belum banyak diketahui dengan pasti, tetapi gen-gen tersebut memiliki peran dalam infeksi dan replikasi virus dalam sel limfosit CD4+. *Vpr* dan *vpu* dibutuhkan untuk melakukan infeksi. Produk dari gen *vpr* adalah protein yang berasosiasi dengan virion. Gen *vif*, yang mengkode protease, mengendalikan infektivitas partikel virus. Sedangkan gen *nef* yang dilaporkan mengkode faktor regulator negatif, muncul sebagai gen yang

membawa faktor virulensi. Gen ini bertanggung jawab atas sinyal transduksi seluler dan berperan dalam proses *budding* virus sebagai tahap akhir dari siklus replikasi virus dalam sel pejamu (Belasio et al., 2010; Girard, 1994: 825; Hope & Trono, 2000).



[Sumber : Ramezani & Hawley, 2001, telah diolah kembali]

Keterangan : A. Genom HIV-1 dengan gen-gen yang tersusun sepanjang rantai DNA virus, diantaranya gen pengkode protein struktural, *gag*, *pol* dan *env*; gen pengkode protein regulator, *tat* dan *rev*; dan gen pengkode protein aksesori, *vpu*, *vpr*, *vif* dan *nef*; B. Struktur anatomi HIV-1 yang terdiri dari berbagai protein struktural hasil ekspresi gen *gag*, *pol* dan *env*.

Gambar 2.2. Genom HIV-1 (A) dan Struktur anatomi HIV-1 (B)

2.1.2. Epidemiologi HIV-1

Sejak pertama kali ditemukan hingga saat ini telah melewati lebih dari 31 tahun, AIDS masih menjadi penyakit infeksi yang mendapat perhatian besar di

seluruh dunia. Penyakit ini dapat menyebabkan orang yang terinfeksi virusnya mengalami penurunan respon imun tubuh hingga dalam perkembangannya dapat menyebabkan infeksi oportunistik yang berakibat fatal hingga kematian. Kasus AIDS ditemukan pertama kali pada tahun 1981 di San Fransisco dan New York. Pada saat itu, kaum muda homoseksual menunjukkan adanya infeksi oportunistik yang secara khas berhubungan dengan defisiensi imun yang berat seperti *Pneumocystis pneumonia* (PCP) dan Kaposi sarcoma (Bennett, 2011; Girard, 1994; National Institute of Allergy and Infectious Diseases, 2011). Sedangkan kasus pertama AIDS di Indonesia ditemukan pada tahun 1987 yang dilaporkan terjadi di Bali (Komisi Penanggulangan AIDS Nasional, 2011).

HIV dapat ditransmisikan melalui berbagai jalur, tetapi terdapat tiga jalur transmisi utama pada penularan HIV. Pertama, transmisi melalui mukosa genital seperti yang dapat terjadi pada saat berhubungan seksual. Kedua, transmisi langsung ke peredaran darah seperti pada saat transfusi darah yang telah terkontaminasi HIV atau penggunaan jarum suntik bersama dengan orang yang telah terinfeksi HIV. Ketiga, transmisi vertikal dari ibu ke janin yang dapat terjadi saat proses kelahiran atau saat pemberian ASI (Merati & Djauzi, 2006; Bennett, 2011).

Perkembangan pandemi secara global berdasarkan data *Progress report 2011: Global HIV/AIDS response* (WHO, 2011) untuk kasus baru infeksi HIV pada tahun 2010 diperkirakan 2,7 juta orang terinfeksi HIV; untuk kasus kematian terkait AIDS diperkirakan mengalami penurunan dari 2,2 juta orang pada tahun 2005 menjadi 1,8 juta orang pada tahun 2010, tetapi pada rentang 2001 hingga 2010 angka kematian di Eropa Timur, Asia Tengah, Asia Timur, Timur Tengah dan Afrika Barat mengalami peningkatan yang cukup signifikan; dan prevalensi HIV hingga akhir 2010 diperkirakan 34 juta orang hidup dengan HIV.

Sedangkan perkembangan epidemi HIV/AIDS di Indonesia hingga tahun 2011 untuk jumlah kasus HIV/AIDS secara kumulatif mengalami penurunan. Menurut Direktur Pengendalian Penyakit Menular Langsung Kementerian Kesehatan, M. Subuh, mengatakan bahwa dari total populasi 240 juta jiwa, Indonesia memiliki prevalensi HIV 0,24 persen dengan estimasi ODHA 186.000 (Agustia, 2011). Dalam melakukan pengendalian untuk mengakhiri epidemi,

berbagai cara dilakukan dengan kerjasama berbagai pihak baik sipil maupun pemerintah dengan melakukan promotif, preventif dan kuratif (Agustia, 2011; Komisi Penanggulangan AIDS Nasional, 2011). Penanggulangan infeksi HIV-1 di Indonesia dilakukan dengan cara memberikan pengobatan suportif untuk meningkatkan keadaan umum penderita; pengobatan infeksi oportunistik yang dilakukan secara empiris; dan pengobatan Antiretroviral (ART) yang terbukti bermanfaat memperbaiki kualitas hidup, menekan morbiditas dan mortalitas dini. Namun penggunaan ART memiliki kendala antara lain ketidakpatuhan penderita dalam minum obat secara teratur, adanya efek samping obat, harga obat yang relatif mahal dan dapat terjadinya resistensi virus terhadap ART (Susilo, 2006).

HIV merupakan virus yang memiliki tingkat mutasi yang tinggi. Hal ini berarti terdapat banyak subtype HIV yang berbeda, bahkan dalam satu tubuh orang yang terinfeksi. Tingkat mutasi tinggi yang dimiliki HIV tersebut menjadi salah satu penyebab kegagalan sistem imun untuk mengeradikasi HIV (Avert, 2011; Kresno, 2010). Hal itulah yang kemungkinan menjadi penyebab HIV dapat menyebar dengan cepat dan hingga saat ini belum ditemukan strategi yang paling efektif dan aman untuk menghentikan pandemi yang terjadi di berbagai negara di dunia.

2.1.3. Patogenesis HIV dan AIDS

2.1.3.1. Mekanisme Imunitas pada Keadaan Normal

Aktivasi sel Th (sel T *helper*) dalam keadaan normal terjadi pada awal terjadinya respon imunitas. Th dapat teraktivasi melalui dua sinyal. Pertama, terikatnya reseptor Ag-TCR (reseptor sel T) dengan kompleks Ag-molekul MHC kelas II yang disajikan APC (sel penyaji antigen), seperti makrofag, yang teraktivasi oleh antigen. Kedua, berasal dari sitokin IL-1 yang dihasilkan oleh APC yang teraktivasi tadi. Kedua sinyal tadi akan merangsang Th mengekspresikan reseptor IL-2 dan produksi IL-2 dan sitokin lain yang dapat mengaktivasi makrofag, sel limfosit T sitotoksik (sel Tc) dan sel limfosit B. IL-2 juga akan berfungsi autoaktivasi terhadap sel Th semula dan sel Th lainnya yang belum memproduksi IL-2 untuk berproliferasi. Dengan demikian akan terjadi amplifikasi respon yang diawali oleh kontak APC dengan sel Th semula.

Aktivasi sel Tc (sel T sitotoksik) berfungsi untuk membunuh benda asing atau *nonself*-antigen. Sel Tc dapat dibedakan dengan Th karena Tc mempunyai molekul CD8 dan akan mengenal antigen asing melalui molekul MHC kelas I. Seperti sel Th, sel Tc juga teraktivasi melalui dua sinyal. Pertama, berasal dari interaksi antara reseptor Ag-TCR dengan kompleks epitop benda asing dan molekul MHC kelas I. Sel tersebut bisa berupa sel tumor atau jaringan asing. Kedua, berasal dari rangsangan sitokin IL-2 yang diproduksi oleh sel Th tersebut. Sel lain yang juga berperan dalam imunitas seluler adalah sel NK (*Natural Killer*), yaitu sel limfosit dengan granula kasar dengan petanda CD16 dan CD56. Fungsinya secara non-spesifik menghancurkan langsung sel-sel asing, sel tumor atau sel terinfeksi virus. Namun, sel NK juga dapat berfungsi secara spesifik menghancurkan sel-sel yang dilapisi oleh ADCC (*antibody dependent cell mediated cytotoxicity*).

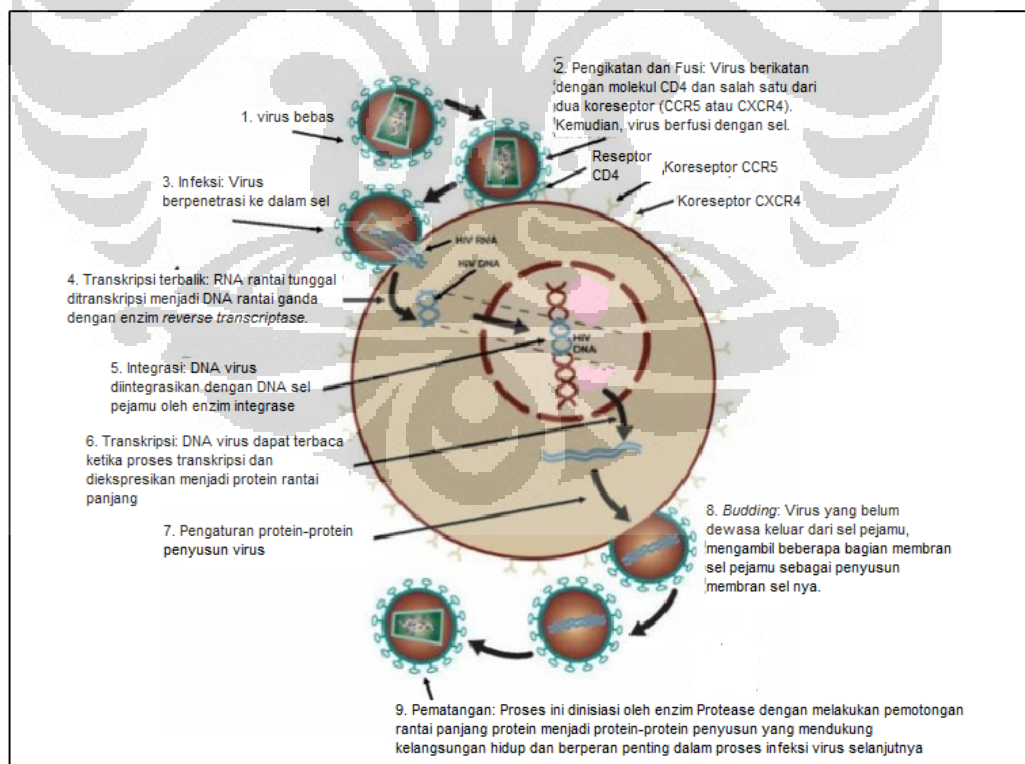
Sedangkan aktivasi sel limfosit B memerlukan paling sedikit tiga sinyal. Pertama, sinyal dari imunogen yang terikat pada reseptor antigen. Selanjutnya, dua sinyal lainnya adalah limfokin BCDF (*B cell differentiation factor*) dan BCGF (*B cell growth factor*) yang diproduksi oleh sel Th yang teraktivasi. Dengan aktivasi sel limfosit B, maka akan terjadi pertumbuhan dan diferensiasi sel limfosit B menjadi sel plasma sebagai sel yang akan memproduksi antibodi (Merati & Djauzi, 2006).

2.1.3.2. Siklus HIV

Infeksi HIV dimulai saat terjadinya pengikatan gp120 dengan reseptor CD4 yang ada di permukaan sel sasaran (lihat gambar 2.3). Langkah ini menginduksi perubahan konformasi yang mempermudah pengikatan gp120 pada salah satu koreseptor (CCR5 atau CXCR4) yang terjadi kemudian. Pengikatan koreseptor menginduksi perubahan konformasi pada gp41 yang menyebabkan pemaparan bagian hidrofobik yang menancap pada membran dan meningkatkan fusi virus dengan membran. Segera setelah virion HIV masuk ke dalam sel, enzim dalam kompleks nukleoprotein menjadi aktif dan dimulailah siklus reproduksi. Nukleoprotein inti virus pecah, gen RNA HIV ditranskripsi menjadi DNA untai ganda oleh *reverse transcriptase* lalu DNA virus masuk ke dalam nukleus sel

pejamu. Enzim integrase juga masuk ke dalam nukleus dan mengkatalisis integrasi DNA virus dengan gen pejamu. DNA virus HIV yang terintegrasi disebut provirus.

Transkripsi gen DNA provirus terintegrasi diatur oleh LTR, sedangkan sitokin atau rangsangan fisiologik lain pada sel T atau makrofag seperti IL-2, TNF, IL-3, IFN-g, dan GM-CSF akan mempermudah transkripsi gen virus. Sintesis partikel virus yang matang dimulai setelah transkrip gen RNA virus yang lengkap diproduksi dan berbagai gen virus diekspresikan sebagai protein. Setelah transkripsi berbagai gen, protein virus disintesis dalam sitoplasma, lalu disusunlah partikel virus dengan membungkus gen provirus dalam kompleks nukleoprotein termasuk protein *gag* dan *pol* yang diperlukan untuk siklus integrasi berikutnya. Nukleoprotein ini kemudian dibungkus dalam selubung membran dan dilepaskan oleh sel dengan proses *budding* melalui membran sel. Selubung fosfolipid dua lapis yang terbentuk pada proses ini berasal dari membran sel pejamu. Partikel-partikel HIV bebas yang telah matang dapat berikatan dengan sel lain yang tidak terinfeksi (Kresno, 2010).



[sumber: Subramani, Rajakannu, Sudhakar, & Jayaprakash, 2005, telah diolah kembali]

Gambar 2.3 Siklus replikasi HIV

2.1.3.3. Pengaruh HIV terhadap Sistem Imun

Penyakit HIV dimulai dengan infeksi akut yang hanya sebagian saja dapat diatasi oleh respon imun adaptif, dan berlanjut menjadi infeksi kronik progresif dari jaringan limfoid perifer. Limfosit CD4⁺ (sel Th) merupakan target utama infeksi HIV karena virus mempunyai afinitas terhadap molekul permukaan CD4. Limfosit CD4⁺ berfungsi mengoordinasikan sejumlah fungsi imunologis yang penting. Hilangnya fungsi tersebut menyebabkan gangguan respon imun yang progresif (Kresno, 2010; Djoerban & Djauzi, 2006).

Perjalanan penyakit dapat dipantau dengan mengukur jumlah virus dalam serum pasien dan menghitung jumlah sel T CD4⁺ dalam darah tepi. Besar kemungkinan bahwa sel dendritik (salah satu APC) berperan dalam penyebaran awal HIV dalam jaringan limfoid, karena fungsi normal sel dendritik adalah menangkap antigen dalam epitel lalu masuk ke dalam kelenjar getah bening. Kemudian sel dendritik meneruskan virus ke sel T melalui kontak antar sel. Setelahnya jumlah virus dalam kelenjar berlipat ganda dalam beberapa hari saja setelah infeksi dan mengakibatkan viremia. Viremia menyebabkan virus menyebar di seluruh tubuh dan menginfeksi berbagai sel, diantaranya sel T, monosit maupun makrofag dalam jaringan limfoid perifer. Setelah infeksi akut terjadi, dilanjutkan fase kedua dimana kelenjar getah bening dan limpa merupakan tempat replikasi virus dan destruksi jaringan terjadi terus menerus. Selama periode ini sistem imun dapat mengendalikan sebagian besar infeksi, karena itu fase ini disebut fase laten. Hal tersebut mungkin dapat dihubungkan sementara dengan adanya pembentukan respon imun spesifik. Hanya sedikit virus diproduksi selama fase laten dan sebagian besar sel T dalam darah tidak mengandung virus. Walaupun demikian, destruksi sel T dalam jaringan limfoid terus berlangsung sehingga jumlah sel T makin lama makin menurun. Jumlah sel T dalam jaringan limfoid adalah 90% dari jumlah sel T di seluruh tubuh. Pada awalnya sel T dalam darah perifer yang rusak oleh virus HIV dengan cepat diganti oleh sel baru tetapi destruksi sel oleh virus HIV yang terus bereplikasi dan menginfeksi sel baru selama masa laten akan menurunkan jumlah sel T dalam darah tepi (Kresno, 2010). Replikasi HIV berada pada keadaan *steady state* beberapa bulan setelah infeksi. Kondisi ini bertahan relatif stabil selama beberapa tahun, namun lamanya

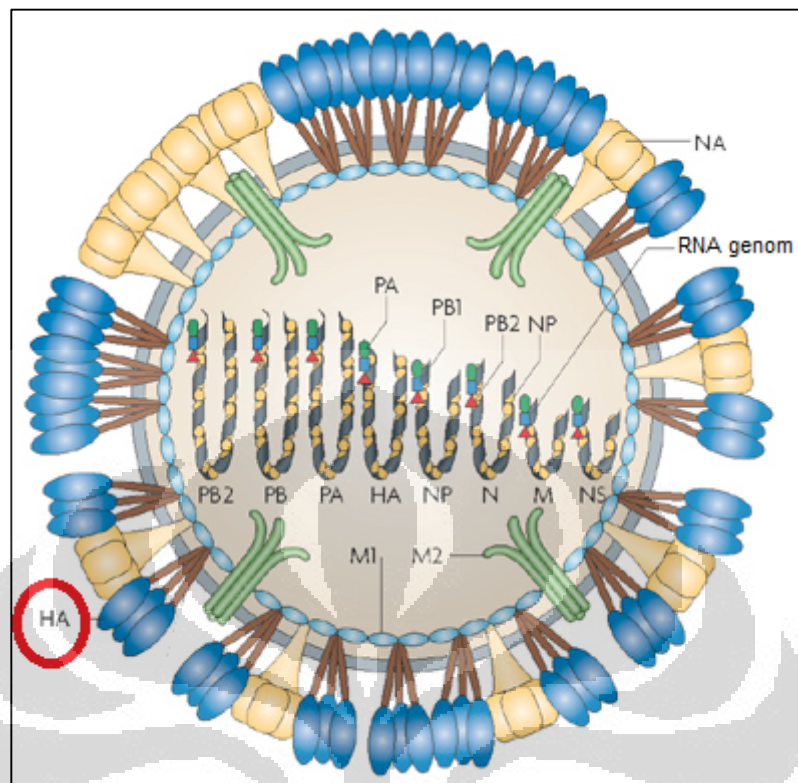
sangat bervariasi. Faktor yang mempengaruhi tingkat replikasi HIV tersebut, dengan demikian juga perjalanan kekebalan tubuh pejamu, adalah heterogenitas kapasitas replikasi virus dan heterogenitas intrinsik pejamu (Djoerban & Djauzi, 2006).

Antibodi muncul di sirkulasi dalam beberapa minggu setelah infeksi, namun secara umum dapat dideteksi pertama kali setelah replikasi virus telah menurun sampai ke level *steady state*. Walaupun antibodi ini umumnya memiliki aktifitas netralisasi yang kuat melawan infeksi virus, namun ternyata tidak dapat mematikan virus. Virus dapat menghindari netralisasi oleh antibodi dengan melakukan adaptasi pada selubungnya, termasuk kemampuannya mengubah situs glikosilasinya, akibatnya konfigurasi tiga dimensinya berubah sehingga netralisasi yang diperantarai antibodi tidak dapat terjadi (Djoerban & Djauzi, 2006: 1804).

Selama masa kronik progresif, respon imun terhadap infeksi lain akan merangsang produksi HIV dan mempercepat destruksi sel T. Selanjutnya penyakit menjadi progresif dan mencapai fase letal yang disebut AIDS, pada saat destruksi sel T dalam jaringan limfoid perifer lengkap dan jumlah sel T dalam darah tepi menurun hingga di bawah $200/\text{mm}^3$. Viremia meningkat drastis karena replikasi virus di bagian lain dalam tubuh meningkat. Pasien menderita infeksi oportunistik, cachexia, keganasan dan degenerasi susunan saraf pusat. Kehilangan limfosit CD4+ menyebabkan pasien peka terhadap berbagai jenis infeksi dan menunjukkan respon imun yang inefektif terhadap virus onkogenik (Kresno, 2010).

2.2. Hemaglutinin Virus Influenza H5N1

Hemaglutinin yang dikenal dengan HA merupakan salah satu glikoprotein penyusun membran sel virus influenza. Jika dilihat dari permukaan sel virus, HA merupakan salah satu bagian dari permukaan membran virus yang menonjol keluar (gambar 2.4). Suatu virus influenza mengandung sekitar 500 molekul HA yang tampak menonjol keluar permukaan.



[sumber: Hedestam, Fouchier, Phogat, Burton, Sodroski, & Wyatt, 2008, telah diolah kembali]

Keterangan : Lingkaran merah menunjukkan hemaglutinin (HA) virus influenza yang menonjol di permukaan membran sel virus.

Gambar 2.4 Struktur virus influenza

Nama HA berkaitan dengan aktivitas yang dapat dilakukannya. Glikoprotein ini mampu untuk mengaglutinasi, atau menggumpalkan sel darah merah. Kejadian tersebut dapat mengganggu fungsi sel darah merah. HA juga berfungsi dalam pengikatan virus ke sel, melalui pengenalan struktur kimia pada permukaan sel yang dikenal sebagai asam sialat. Pengikatan HA pada senyawa asam sialat di permukaan sel adalah suatu langkah awal dalam asosiasi virus dengan sel epitel manusia. Kedua fungsi HA tersebut merupakan aktivitas yang penting terkait kemampuan infeksius suatu virus influenza. Oleh karena itu, HA menjadi faktor virulensi utama pada virus influenza (World of Microbiology and Immunology, 2003).

Hemagglutinin memiliki 5 situs antigenik berdasarkan analisa protein H3N2 yaitu situs A, B, C, D dan E. Situs A dan situs B membentuk struktur *loop*, situs C berada pada bagian dasar globular HA1, situs D berada di dekat permukaan trimerik domain globular, dan situs E berada pada dasar globular antara situs C dan situs A (Fields, 2007). Sebelumnya terdapat beberapa penelitian terdahulu yang telah menggunakan protein HA sebagai rangka untuk meyisipkan epitop suatu antigen lain pada situs antigeniknya. Seperti yang telah dilakukan Muster dkk. (1994) yaitu meyisipkan epitop netralisasi HIV-1 pada situs antigenik HA H1N1. Hasil penelitian tersebut menunjukkan adanya induksi antibodi spesifik namun masih dalam tahap sedang.

Virus H5N1 diketahui dapat mengakibatkan induksi sitokin proinflamasi yang berlebihan akibat pengaruh replikasi virus yang dapat terjadi pada beberapa organ. Hal tersebut mungkin akibat pengaruh HA dan NA (Neuraminidase) sebagai bagian dari permukaan membran virus (lihat gambar 2.4) (Cheng, Xu, Song, Yang, Kemble, & Jin, 2010). Pada penelitian ini akan digunakan suatu plasmid rekombinan yang mengandung sisipan gen HA virus H5N1 yang telah dimutasi pada bagian situs antigenik B. Plasmid rekombinan tersebut telah berhasil dikonstruksi pada penelitian sebelumnya (Agustian, 2012, *unpublish*). Mutasi yang dilakukan berupa insersi gen penyandi epitop MPER, yaitu ELDKWAS. Lokasi sisipan epitop ELDKWAS pada protein HA pada posisi asam amino 169-170.

2.3. Antigen, Imunogen dan Antibodi

Istilah antigen dahulu diartikan sebagai molekul yang dapat merangsang pembentukan antibodi, tetapi sekarang istilah antigen digunakan untuk menyebut substansi yang mampu bereaksi dengan antibodi yang diproduksi oleh sel B atas rangsangan imunogen, tanpa mempertimbangkan apakah antigen itu sendiri bersifat imunogenik. Imunogen sendiri merupakan suatu substansi yang memiliki kemampuan merangsang respon imun, baik respon seluler maupun humoral atau keduanya, apabila substansi tersebut dimasukkan ke dalam tubuh. Dari pengertian tersebut, dapat disimpulkan bahwa semua imunogen adalah antigen tetapi tidak semua antigen merupakan imunogen (Kresno, 2010).

Antigen poten alamiah terbanyak adalah protein besar dengan berat molekul lebih dari 40.000 dalton dan kompleks polisakarida mikrobial. Berikut merupakan pembagian antigen berdasarkan sifat kimiawinya (Baratawidjaja & Rengganis, 2006):

a. Hidrat arang (polisakarida)

Hidrat arang pada umumnya imunogenik. Glikoprotein yang merupakan bagian dari permukaan sel mikroorganisme dapat menimbulkan respon imun terutama pembentukan antibodi. Contoh lain adalah respon imun yang ditimbulkan golongan darah ABO, sifat antigen dan spesifisitas imunnya berasal dari polisakarida pada permukaan sel darah merah.

b. Lipid

Lipid biasanya tidak imunogenik, tetapi menjadi imunogenik bila berikatan dengan protein pembawa. Suatu substansi kimia yang berukuran kecil dan membutuhkan molekul besar (protein pembawa) untuk dapat bersifat imunogenik disebut sebagai hapten. Hapten membentuk epitop pada molekul pembawa yang dikenal sistem imun dan merangsang pembentukan antibodi.

c. Asam nukleat

Asam nukleat tidak imunogenik, tetapi dapat menjadi imunogenik bila diikat protein molekul pembawa. Respon imun terhadap DNA terjadi pada pasien dengan Lupus Eritematosus Sistemik (LES).

d. Protein

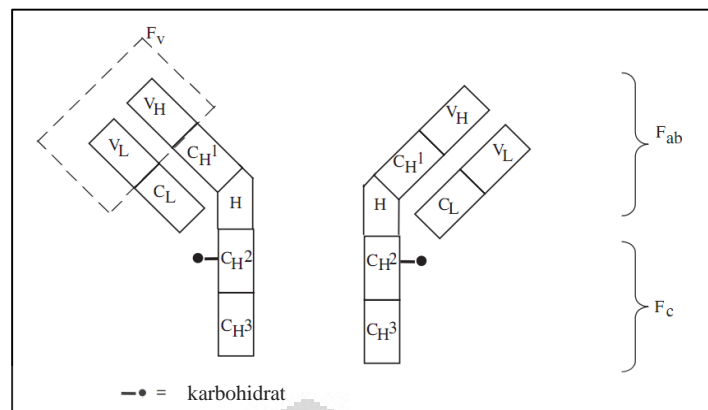
Kebanyakan protein adalah imunogenik dan pada umumnya multideterminan dan univalen. Multideterminan-univalen merupakan antigen yang memiliki banyak epitop yang bermacam-macam tetapi hanya satu dari setiap macamnya.

Epitop atau determinan antigen adalah bagian dari antigen yang dapat membuat kontak fisik dengan reseptor antibodi, menginduksi pembentukan antibodi. Bagian ini dapat diikat dengan spesifik oleh bagian dari antibodi atau oleh reseptor antibodi. Makromolekul dapat memiliki berbagai epitop yang masing-masing merangsang produksi antibodi spesifik yang berbeda. Sedangkan bagian dari antibodi yang berikatan dengan epitop disebut paratop.

Imunoglobulin (Ig) merupakan molekul yang disintesis oleh sel B dalam dua bentuk yang berbeda, yaitu sebagai reseptor permukaan (untuk mengikat

antigen) dan sebagai antibodi yang disekresikan ke dalam cairan ekstraseluler. Antibodi yang disekresikan dapat berfungsi sebagai adaptor yang mengikat antigen melalui tempat pengikatan (*binding site*) yang spesifik, sekaligus merupakan jembatan yang menghubungkan antigen dengan sel-sel sistem imun atau mengaktivasi komplemen. Antibodi yang dibentuk sebagai reaksi terhadap salah satu jenis antigen mempunyai susunan asam amino yang berbeda dengan antibodi yang dibentuk terhadap antigen lain, dan masing-masing hanya dapat berikatan dengan antigen yang relevan. Sifat inilah yang disebut spesifisitas antibodi.

Opcionisasi antigen oleh imunoglobulin meningkatkan fagositosis, memudahkan APC memproses dan meyajikan antigen kepada sel T, dan meningkatkan fungsi sel NK dalam mekanisme ADCC (*antibody dependent cytotoxicity*). Terdapat lima kelas utama imunoglobulin yang diklasifikasikan berdasarkan perbedaan dalam struktur kimianya, yaitu IgG, IgA, IgM, IgD dan IgE. Semua molekul Ig mempunyai 4 polipeptida dasar yang terdiri dari dua rantai berat (*heavy chain*) dan dua rantai ringan (*light chain*) yang dapat dihubungkan satu dengan lainnya oleh ikatan disulfida. Molekul ini oleh enzim proteolitik papain dapat dipecah menjadi tiga fragmen, yaitu dua fragmen yang mempunyai susunan sama terdiri atas rantai H dan rantai L, disebut fragmen Fab yang dibentuk oleh domain terminal-N; dan satu fragmen yang hanya terdiri dari rantai H saja disebut fragmen Fc yang dibentuk oleh domain terminal-C. Fragmen Fab berfungsi mengikat antigen, karena itu susunan asam amino di bagian ini sangat variabel sesuai dengan variabilitas antigen yang merangsang pembentukannya. Sedangkan Fc merupakan fragmen yang tidak mempunyai kemampuan mengikat antigen tetapi dapat bersifat sebagai antigen (determinan antigen) (Baratawidjaja & Rengganis, 2006: 238; Kresno, 2010: 26).



[Sumber: Walsh, 2007, telah diolah kembali]

Keterangan : Rantai H dan rantai L mengandung domain *variable* (V) sebagai tempat pengikatan antigen dan *constant* (C); rantai L mengandung masing-masing satu domain V dan C; rantai H mengandung satu V dan tiga macam C (CH1, CH2 dan CH3); sekuens tunggal rantai H (daerah *hinge*) yang menghubungkan CH1 dan CH2 merupakan tempat terjadinya fragmentasi antibodi oleh enzim proteolitik seperti papain.

Gambar 2.5 Struktur dasar imunoglobulin

2.4. Vaksin

Vaksin merupakan suatu preparasi yang dimaksudkan untuk membentuk imunitas terhadap suatu penyakit dengan menstimulasi pembentukan antibodi. Metode pemberian vaksin yang paling umum yakni melalui injeksi, tapi ada pula beberapa vaksin yang diberikan melalui mulut atau nasal (WHO, 2012).

Vaksin berperan penting dalam menginduksi memori imunologik pada sel T, sel B dan APC. Salah satu hal yang penting pada memori sel T adalah antigen yang diperlukan untuk menstimulasi respon imun kedua dan seterusnya lebih sedikit dibandingkan kebutuhan antigen untuk merangsang respon awal (Budi W. & Djauzi, 2006).

Beberapa jenis vaksin dibuat berdasarkan proses produksinya (Budi W. & Djauzi, 2006: 276-277), antara lain :

a. Vaksin hidup dilemahkan (*Live attenuated vaccines*)

Vaksin jenis ini memerlukan replikasi organisminya (terutama virus) pada penerima vaksin untuk meningkatkan rangsangan antigen. Proses melemahkan antigen tersebut melalui pembiakan sel, pertumbuhan jaringan embrionik pada suhu rendah atau pengurangan gen patogen secara selektif. Biasanya vaksin ini

memberikan imunitas jangka panjang. Tetapi dalam perkembangannya saat ini, vaksin hidup dilemahkan sudah tidak diujicobakan lagi ke manusia karena alasan keamanan (Girard, Osmanov, Assossou, & Kieny, 2011).

b. Vaksin yang tidak aktif (Inactivated vaccines)

Vaksin ini mengandung organisme yang tidak aktif setelah melalui proses pemanasan atau penambahan bahan kimiawi (misalnya aseton, formalin, timerosal, fenol). Biasanya pemberian vaksin ini perlu beberapa dosis dan diperlukan bahan ajuvan untuk meningkatkan respon imunologik.

c. Rekombinan

Susunan vaksin ini memerlukan epitop organisme yang patogen. Sintesa dari antigen vaksin tersebut melalui isolasi dan penentuan kode gen epitop bagi sel penerima vaksin.

d. Vaksin plasmid DNA

Vaksin ini berdasarkan isolasi DNA mikroba yang mengandung kode antigen yang patogen dan saat ini sedang dalam perkembangan penelitian. Hasil akhir penelitian pada binatang percobaan menunjukkan bahwa vaksin DNA (virus maupun bakteri) merangsang respon humoral dan seluler yang cukup kuat. Sedangkan penelitian klinis pada manusia saat ini sedang dilakukan.

Terdapat berbagai macam cara pemberian vaksin seperti intramuskular, subkutan, intradermal, intranasal ataupun oral. Sebaiknya vaksin diberikan pada tempat dimana respon imun yang diharapkan tercapai dan terjadinya kerusakan jaringan, saraf dan vaskular minimal (W. & Djauzi, 2006). Namun, pada banyak penelitian pemberian secara intramuskular paling sering dilakukan pada hewan coba.

2.4.1. Vaksin HIV

Pada penyakit HIV/AIDS, vaksinasi dapat berguna sebagai pencegahan ataupun pengobatan. Vaksinasi dengan tujuan pencegahan dapat ditujukan pada orang sehat yang negatif HIV atau yang memiliki risiko tinggi terinfeksi HIV, dengan harapan dapat meningkatkan imunitas humoral maupun seluler terhadap HIV sebelum adanya paparan virus. Sedangkan vaksinasi untuk terapi dapat diberikan pada orang yang telah terinfeksi HIV dengan tujuan menyembuhkan

ataupun memulihkan kesehatannya. Vaksin HIV dapat digunakan untuk tujuan proteksi terhadap infeksi HIV, proteksi terhadap perkembangan penyakit, mengendalikan replikasi virus dan mereduksi transmisi virus. Karakteristik vaksin AIDS yang ideal yaitu memiliki efikasi dalam mencegah transmisi melalui rute mukosal dan parenteral; memiliki profil keamanan yang baik; pemberiannya dosis tunggal; menghasilkan efek jangka panjang dalam melakukan proteksi selama bertahun-tahun setelah vaksinasi; harganya murah; stabil; mudah dalam pemberian dan pengangkutan; memiliki kemampuan dalam perlindungan terhadap infeksi isolat virus yang beragam (Sahni & Nagendra, 2004).

2.4.2. Vaksin DNA

Saat ini terdapat banyak alternatif untuk pembuatan vaksin HIV. Strategi pembuatan vaksin klasik dengan melemahkan virus hidup atau inaktivasi virus utuh memiliki beberapa keterbatasan. Risiko dari vaksin yang dibuat dari virus yang dilemahkan yakni adanya kemungkinan terjadinya pengembalian virulensi, rekombinasi genetik intraseluler, ataupun aktivasi LTR dari proto-onkogen. Sedangkan risiko utama yang dihadapi dari vaksin virus utuh yang diinaktivasi adalah kesulitan dalam menentukan ketiadaan dari residu virus yang menginfeksi dalam produksi skala besar. Dengan adanya keterbatasan tersebut, pengembangan vaksin saat ini telah difokuskan pada pendekatan baru, diantaranya yaitu vaksin DNA (Girard M., 1994; Sahni & Nagendra, 2004).

Awalnya Ulmer et al (1997), melakukan percobaan untuk memperoleh imunitas protektif dengan menginjeksikan plasmid, yang mengekspresikan nukleoprotein (protein internal virus influenza), pada mencit. Hasilnya diperoleh antibodi anti-nukleoprotein dan sel limfosit T sitotoksik yang spesifik terhadap nukleoprotein. Sejak percobaan pertama tersebut, banyak peneliti lain yang mengujicobakan vaksin DNA pada banyak hewan coba untuk berbagai infeksi virus. Berdasarkan hasil penelitian-penelitian tersebut disimpulkan bahwa vaksinasi DNA (plasmid) rekombinan dapat menghasilkan respon imun protektif pada banyak hewan coba dan berbagai penyakit.

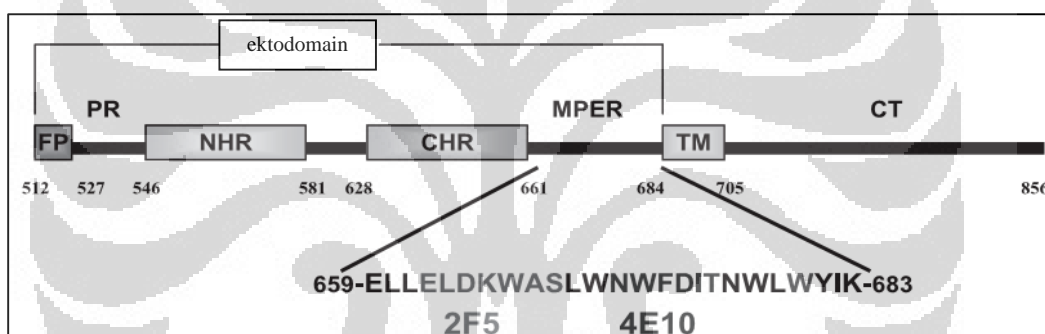
Vaksinasi DNA pada hewan coba biasanya diinjeksikan melalui otot (intramuskular) atau epidermis. Pada vaksin DNA untuk HIV, komposisi vaksin

adalah plasmid DNA dari bakteri yang telah diinsersi DNA HIV atau gen pengkode antigen (*env* ataupun daerah inti dari virus) dari HIV. Ekspresi gen pengkode antigen diharapkan dapat mencetuskan respon imun yang kuat dari humoral, seluler, dan *cell-mediated*. Penggunaan DNA yang telah dipurifikasi sebagai vaksin memiliki berbagai kelebihan, diantaranya kemudahan dalam merancang dan preparasi, aman, stabil dan tidak adanya kontaminan (Girard M., 1994; Sahni & Nagendra, 2004). Vaksin DNA dapat memaparkan antigen lebih lama dibandingkan dengan protein subunit dan dapat diberikan dalam jumlah yang lebih sedikit, namun masih perlu dibutuhkan *booster* untuk dapat meningkatkan respon imun spesifik. Penggunaan adjuvan dalam vaksinasi DNA dibutuhkan karena jenis vaksin ini memiliki imunogenitas yang lebih rendah dibandingkan vaksin jenis lain (Wong-Staal, 2002).

Mekanisme aksi secara umum yang terjadi saat dilakukan vaksinasi DNA diawali dengan masuknya plasmid ke dalam nukleus dimana gen akan mengalami transkripsi, lalu protein diproduksi dalam sitoplasma. Protein hasil ekspresi yang disekresikan dapat menginduksi Th, sitokin, dan antibodi yang dapat bereaksi dengan virus. APC menyajikan peptida (sebagai antigen) dengan adanya ikatan Ag-MHC I, sehingga antigen dikenali oleh sel Tc dan selanjutnya mengaktifasi sitokin. Pada vaksin yang diberikan untuk tujuan terapi, sel Tc yang telah teraktivasi dapat melakukan lisis pada sel pejamu yang telah terinfeksi HIV. Aktivasi sitokin lebih lanjut dapat menyebabkan teraktivasinya sel NK yang secara non-spesifik dapat melisis sel yang terinfeksi virus atau sel yang menyajikan protein asing. Sedangkan pada pemberian vaksin yang ditujukan untuk pencegahan, antigen yang disajikan oleh APC melalui pengikatan Ag-MHC II dapat mengaktifasi Th. Dengan teraktivasinya sel Th, sel lain seperti sitokin, sel B, dan sel Tc juga dapat teraktivasi. Sel B yang teraktivasi diharapkan dapat berproliferasi dan berdiferensiasi membentuk antibodi spesifik terhadap antigen yang disajikan sehingga jika suatu saat terdapat virus HIV yang menginfeksi, virus tersebut sudah dapat dikenali secara spesifik dan dinetralisasi oleh antibodi yang sebelumnya telah terbentuk pada saat vaksinasi (Donnelly, Wahren, & Liu, 2005).

2.5. MPER gp41 HIV-1

Protein selubung gp41 merupakan protein transmembran yang terdapat di permukaan membran luar virus dan memiliki peran penting dalam infeksi virus HIV ke sel host. Protein ini terdiri dari sekitar 345 asam amino dengan massa 41 kDa. Glikoprotein gp41 terbagi menjadi tiga domain utama, yaitu region ekstraseluler yang disebut ektodomain (asam amino 512-683), domain transmembran (asam amino 684-705) dan domain ekor sitoplasma (CT) (asam amino 705-856). Ektodomain mengandung beberapa determinan fungsional yang berbeda, yang terkait dengan fusi virus dan membran sel *host*. Oleh karena itu, gp41 merupakan protein transmembran yang terdiri dari berbagai daerah yang memiliki fungsi unik pada tiap domainnya (Montero, van Houten, Wang, & Scott, 2008).



[Sumber : (Montero, van Houten, Wang, & Scott, 2008, telah diolah kembali)]

Keterangan: Asam amino 659-683 merupakan asam amino penyusun MPER. Epitop yang terkandung dalam MPER, yakni ELDKWAS dikenali oleh monoklonal antibodi netralisasi 2F5, dan NWFDTI dikenali oleh monoklonal antibodi netralisasi 4E10.

Gambar 2.6 Skema domain pada gp41

MPER terdiri dari 24 asam amino C-terminal terakhir dari ektodomain gp41, LLELDKWASLWNWFDITNWLWYIK (asam amino 660 to 683). MPER mengandung epitop yang dikenali oleh tiga monoklonal antibodi netralisasi (2F5, 4E10 dan Z13). MPER memiliki peran penting untuk aktivitas fusi dan inkorporasi *Env* kedalam virion. Kesimpulan tersebut berdasarkan hasil studi yang dilakukan oleh Salzwedel *dkk* yang menunjukkan bahwa penghilangan 17 asam amino (666-682) menyebabkan kemampuan *Env* untuk transmisi ke sel dan infeksi virus hilang sama sekali.

Peran MPER dalam aktivitas fusi lebih jauh didukung oleh kemampuan tiga monoklonal antibodi netralisasi untuk mengenali epitop pada MPER. Pengikatan antibodi netralisasi terhadap MPER dapat memblokir infeksi. Mekanisme pasti dari proses netralisasi oleh 2F5 dan 4E10 belum sepenuhnya dipahami. Umumnya antibodi netralisasi dapat beraksi pada fase yang berbeda selama proses infeksi virus. Kemungkinan besar mekanisme netralisasi oleh 2F5 dan 4E10 tidak melibatkan pengeblokan perlekatan virus pada reseptor seluler tapi mengganggu proses fusi virus dengan membran sel target. Oleh karena itu, MPER banyak dikembangkan sebagai komponen vaksin HIV untuk dapat menghasilkan imunitas protektif (antibodi netralisasi) (Montero, van Houten, Wang, & Scott, 2008; Xiao-Nan Dong & Ying-Hua Chen, 2006). Beberapa penelitian menunjukkan bahwa adanya modifikasi MPER dapat menginduksi antibodi dengan titer tinggi, namun beberapa masih menunjukkan hasil dengan titer sedang bahkan rendah. Daya netralisasi dari suatu vaksin tidak dijamin oleh tingginya titer antibodi yang dihasilkan, namun tergantung dari kesesuaian struktur MPER yang disisipkan pada imunogen lain (Montero, M., Van Houten, N. E., Wang, X., & Scott, J. K., 2008).

2.6. Plasmid

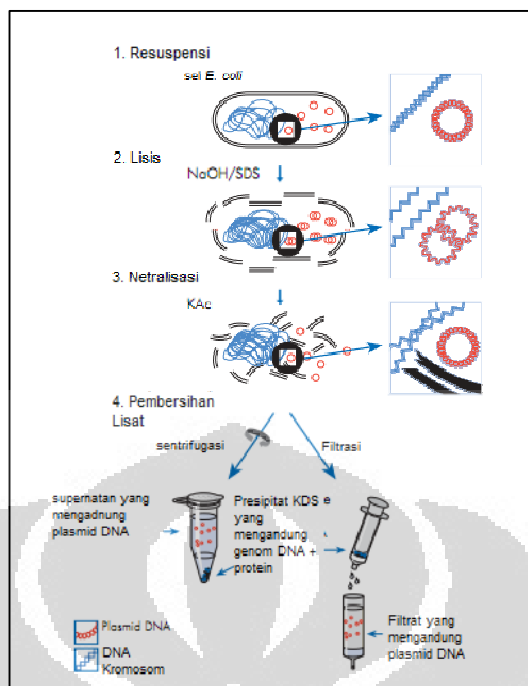
Plasmid bakteri merupakan molekul sirkular tertutup dari DNA untai ganda yang memiliki ukuran 1 sampai lebih dari 200 kb. Plasmid ditemukan pada berbagai spesies bakteri, dimana plasmid tersebut merupakan unit genetik tambahan yang diwarisi dan direplikasi secara independen dari kromosom bakteri. Pada beberapa keadaan, plasmid dapat menguntungkan bagi sel host karena mengandung gen pengkode enzim yang dibutuhkan oleh sel host. Enzim yang dikode tersebut mungkin terlibat dalam pewarisan sifat resistensi sel *host* terhadap antibiotik ataupun toksin. Ketika dimurnikan, plasmid DNA dapat digunakan untuk berbagai aplikasi seperti *sequencing*, PCR, ekspresi protein, transfeksi dan terapi gen (QIAGEN, 2003).

Dalam pembuatan vaksin DNA, plasmid seringkali digunakan sebagai vektor klonal. Semua plasmid dapat digunakan sebagai vektor klonal, tetapi hanya ada beberapa plasmid yang dapat digunakan sebagai vektor ekspresi (Sambrook & Russell, 2001).

Sebelum plasmid hasil rekayasa genetika bisa digunakan dalam vaksin DNA, terlebih dahulu dilakukan preparasi untuk mendapatkan plasmid rekombinan yang murni dalam jumlah yang dibutuhkan untuk vaksinasi. Tahapan awal dari preparasi adalah memilih bakteri yang akan digunakan untuk amplifikasi plasmid, umumnya bakteri *E. coli*. Beberapa alasan pemilihan *E. coli* karena pengkulturan bakteri ini mudah dilakukan, dapat menerima DNA asing dan stabil (Ausubel *dkk*, 1990; Bernard & Payton, 1995). Selanjutnya membuat sel *E. coli* tersebut kompeten. Setiap sel yang memiliki kemampuan untuk mengambil DNA (dari sumber yang bervariasi) disebut kompeten. Setelah sel menjadi kompeten, dilakukan transformasi DNA plasmid ke dalam sel bakteri. Hasil transformasi diperiksa dengan membandingkan adanya pertumbuhan koloni bakteri pada kelompok plasmid uji dengan kontrol (positif dan negatif). Kemudian, bakteri yang mengandung plasmid (sebagai kandidat vaksin) dikultur dalam media yang sesuai, biasanya digunakan medium LB (Luria Bertani) cair. Tahapan selanjutnya adalah isolasi dan purifikasi plasmid dari sel bakteri (QIAGEN, 2003).

Isolasi dan purifikasi plasmid diawali dengan melisis sel bakteri untuk mendapatkan plasmid rekombinan yang diinginkan. Lisis yang tidak sempurna dapat menyebabkan berkurangnya jumlah DNA plasmid yang dapat diperoleh. Situasi yang ideal terjadi apabila setiap sel itu terpecah (lisis) secukupnya sehingga memungkinkan DNA plasmid terlepas tanpa terlalu banyak mengkontaminasi DNA kromosom (Old & Primrose, 1985).

Metode yang umum digunakan untuk melisis sel bakteri adalah *alkaline lysis*. Berikut tahapan dalam metode *alkaline lysis*,



[Sumber : QIAGEN, 2003, telah diolah kembali]

Keterangan : 1. Resuspensi sel; 2. Lisis dengan penambahan NaOH/SDS; 3. Netralisasi dengan penambahan kalium asetat; 4. Membersihkan lisat dari kontaminan.

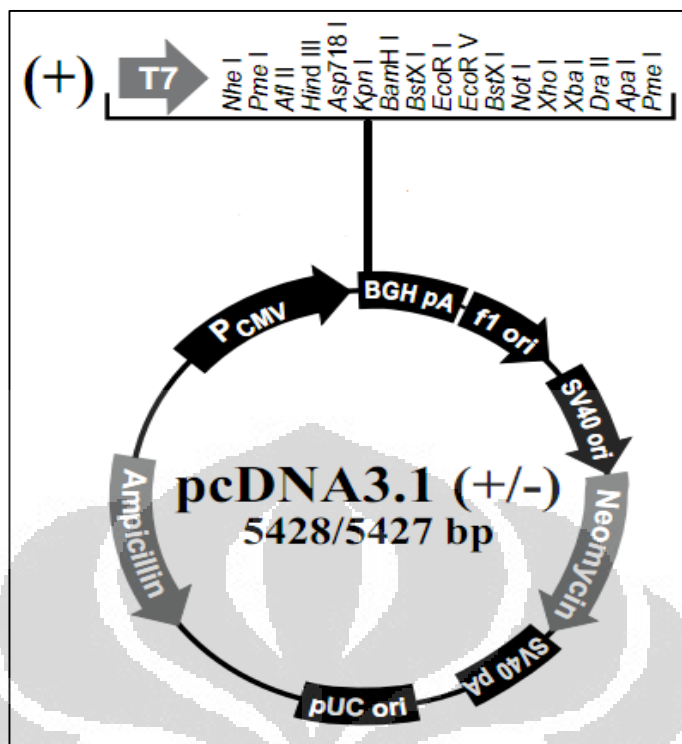
Gambar 2.7 Prosedur lisis dibawah kondisi alkali

Bakteri dilisis dibawah kondisi alkali. Setelah tahap kultur dan resuspensi, sel bakteri dilisis dengan NaOH/SDS dan Rnase A. SDS melarutkan fosfolipid dan protein dari membran sel, sehingga terjadi lisis dan pengeluaran isi sel. Sementara itu, kondisi alkali membuat kromosom dan DNA plasmid terdenaturasi. Waktu pelisisan pada kondisi alkali harus dioptimasi hingga terjadi pengeluaran DNA plasmid yang maksimum tanpa membuat plasmid terdenaturasi secara irreversibel akibat pemaparan alkali yang terlalu lama. Kemudian lisat (hasil lisis) dinetralisasi dengan penambahan *buffer* netralisasi yang mengandung Guanidin hidroklorida dan Asam asetat. Penambahan larutan penyangga N3 ini juga menyebabkan terdenaturasinya protein, DNA kromosom, debris seluler dan SDS terpresipitasi, sementara DNA plasmid mengalami renaturasi dan tetap berada dalam larutan. Untuk mencegah adanya kontaminasi DNA kromosom pada DNA plasmid, pengadukan dan pengocokan kuat harus dihindari selama proses lisis. Sedangkan untuk menghilangkan endapan yang terbentuk dapat dilakukan sentrifugasi dan plasmid dijenuhkan dengan penambahan etanol. Kemudian DNA

plasmid dielusi sebagai tahap akhir dari purifikasi plasmid, dengan menambahkan larutan penyangga elusi yang mengandung imidazol. Hasil purifikasi DNA plasmid selanjutnya dielektroforesis dengan agarose gel. Elektroforesis diperlukan untuk menganalisis apakah hasil isolasi merupakan isolat yang diinginkan (mengandung DNA plasmid yang diinginkan) (Old & Primrose, 1985; QIAGEN, 2003; Birnboim H. , 1983).

2.6.1 pcDNA3.1(+) sebagai Vektor Ekspresi Mamalia

Salah satu plasmid yang dapat digunakan sebagai vektor ekspresi mamalia adalah pcDNA3.1(+). Plasmid tersebut memiliki ukuran 5400 bp dengan promotor Cytomegalovirus (pCMV) yang dapat menginduksi sel untuk mengekspresikan gen sisipan saat berada dalam sel mamalia. Vektor pcDNA3.1(+) memiliki promotor T7 yang digunakan untuk transkripsi in vitro pada DNA *sense*. Selain itu, promotor T7 dapat digunakan sebagai tempat awal sekuensing DNA sisipan. Plasmid ini memiliki gen resisten Neomisin yang digunakan sebagai agen seleksi pada sel mamalia. Promoter dan *origin* SV40 bermanfaat untuk ekspresi Neomisin dan replikasi episomal plasmid dalam sel. Sedangkan gen resisten Ampisilin berguna untuk agen seleksi dalam *E. coli*.



[Sumber : Life Technologies Corporation, 2001, telah diolah kembali]

Keterangan : Pcmv: promotor CMV; BGH pA: *Bovine Growth Hormone polydenylation sequence*; SV40 ORI: promotor SV40 dan *origin of replication*; Neomycin: gen resisten neomisin; Ampicillin: gen resisten ampisilin; SV40pA: SV40 *polydenylation signal*; pUC ori: pUC *origin of replication*.

Gambar 2.8 Bagan vektor ekspresi pcDNA3.1(+)

2.7. Elektroforesis

Elektroforesis merupakan proses bergerakinya molekul bermuatan pada suatu medan listrik. Kecepatan molekul yang bergerak pada medan listrik tergantung pada muatan, bentuk, dan ukuran. Dengan demikian, elektroforesis dapat digunakan untuk pemisahan makromolekul (seperti protein dan asam nukleat). Posisi molekul yang memisah pada gel dapat dideteksi dengan pewarnaan atau autoradiografi, ataupun dilakukan kuantifikasi dengan densitometer. Elektroforesis untuk makromolekul memerlukan matriks penyangga untuk mencegah terjadinya difusi karena timbulnya panas dari arus listrik yang digunakan. Media penyangga biasanya diperlukan sebagai tempat bermigrasinya molekul biologi. Media penyangga tersebut bermacam-macam tergantung pada tujuan dan bahan yang akan dianalisis. Media penyangga yang sering digunakan

dalam elektroforesis antara lain kertas, selulosa asetat, dan gel. gel yang dipakai dapat berupa pati, agarosa, ataupun poliakrilamida (Widyarti, 2011).

2.8. Uji Serologis

Pemeriksaan penyaring yang lazim digunakan adalah pemeriksaan anti-HIV dengan cara ELISA, aglutinasi atau *dot-blot immunobinding assay*. Di Indonesia metode yang biasanya digunakan adalah ELISA, yang apabila positif dipastikan lebih lanjut dengan tes konfirmasi yaitu tes lain yang mempunyai dasar reaksi yang berbeda. Tes konfirmasi yang lazim digunakan adalah tes *Western Blot* (WB) (Silman, 1994; Djoerban & Djauzi, 2006).

Pemeriksaan anti-HIV saat ini menggunakan antigen yang dibuat secara rekombinan DNA atau peptida sintetik sehingga lebih sensitif dan spesifik (Silman, 1994: 83-84). Pada umumnya metode ELISA yang digunakan saat ini untuk mendeteksi anti-HIV maupun antigen HIV cukup sensitif dan sudah dapat dideteksi keberadaannya 1-2 minggu setelah infeksi. Antigen HIV yang paling imunogenik adalah glikoprotein selubung (*env*) yaitu gp120 dan gp41, sehingga anti-gp120 dan anti-gp41 dengan titer tinggi dapat ditemukan dalam darah yang telah terinfeksi (Kresno, 2010; Silman, 1994).

2.8.1. ELISA

Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) adalah suatu teknik untuk mendeteksi antibodi dengan menggunakan label enzim. Kelebihan teknik ELISA diantaranya yaitu sensitif, reagen yang digunakan mempunyai *half life* yang cukup panjang, dapat menggunakan spektrofotometer biasa dan mudah dilakukan otomatisasi, dan yang paling penting adalah tidak mengandung bahaya radioaktif seperti pada teknik RIA. Pada teknik ELISA, dikenal dua macam metode, yakni kompetitif dan non-kompetitif. Apabila Ab digunakan untuk melapisi partikel maka metode ini sering disebut *capture*, karena antigen dalam spesimen seolah-olah ditangkap oleh matriks yang dilapisi Ab. Fase solid atau partikel yang dapat digunakan bermacam-macam, diantaranya plastik, nitroselulose, agarose, gelas, poliakrilamida dan dekstran (Kresno, 2010).

Uji secara tidak langsung, misal pada pengujian infeksi HIV, antigen HIV yang dilekatkan pada benda padat (sumur mikropelat) direaksikan dengan serum. Apabila di dalam serum terdapat anti-HIV, akan terjadi ikatan antigen-antibodi. Setelah dicuci, ditambahkan anti-IgG yang berlabel enzim, sehingga terjadi ikatan antigen-antibodi-anti-IgG enzim. Enzim akan memecah substrat yang ditambahkan dan menghasilkan warna yang dapat dibaca dengan fotometer atau ELISA reader. Pada tes kompetitif, antigen HIV yang dilekatkan pada benda padat direaksikan dengan serum dan anti-HIV berlabel enzim. Terjadi persaingan antara anti-HIV dalam serum (bila ada) dengan anti-HIV berlabel enzim. Setelah dicuci dan ditambahkan substrat, warna yang timbul dibaca dengan fotometer atau ELISA reader. Hasil positif adalah berupa pengurangan warna. Pada antigen sandwich (fase solid, antigen sandwich ganda), antigen yang dilekatkan pada fase padat akan berikatan dengan antibodi dalam serum, yang selanjutnya direaksikan dengan antigen dalam larutan membentuk sandwich. Tes ini peka terhadap antibodi seperti IgM, sehingga peka untuk mendeteksi terjadinya serokonversi (Silman, 1994: 81).

Pada uji serologis dengan ELISA, seringkali digunakan fosfatase alkali (AP) atau *horseradish peroxidase* (HRP) sebagai enzim, dan o-phenylenediamine (OPD) atau tetramethylbenzidine sebagai substratnya. Reaksi hidrolisis substrat oleh enzim biasanya dihentikan dengan membubuhkan asam atau basa kuat, seperti asam sulfat (Kresno, 2010: 510-511).

BAB 3 METODE PENELITIAN

3.1. Metode Umum Penelitian

Penelitian laboratorium eksperimental ini bertujuan untuk mengetahui respon imun humoral terhadap vaksin DNA HIV-1, khususnya dalam menginduksi respon antibodi spesifik MPER-gp41 HIV-1. Untuk mendeteksi adanya antibodi spesifik tersebut digunakan metode ELISA berbasis antigen peptida ELDKWAS.

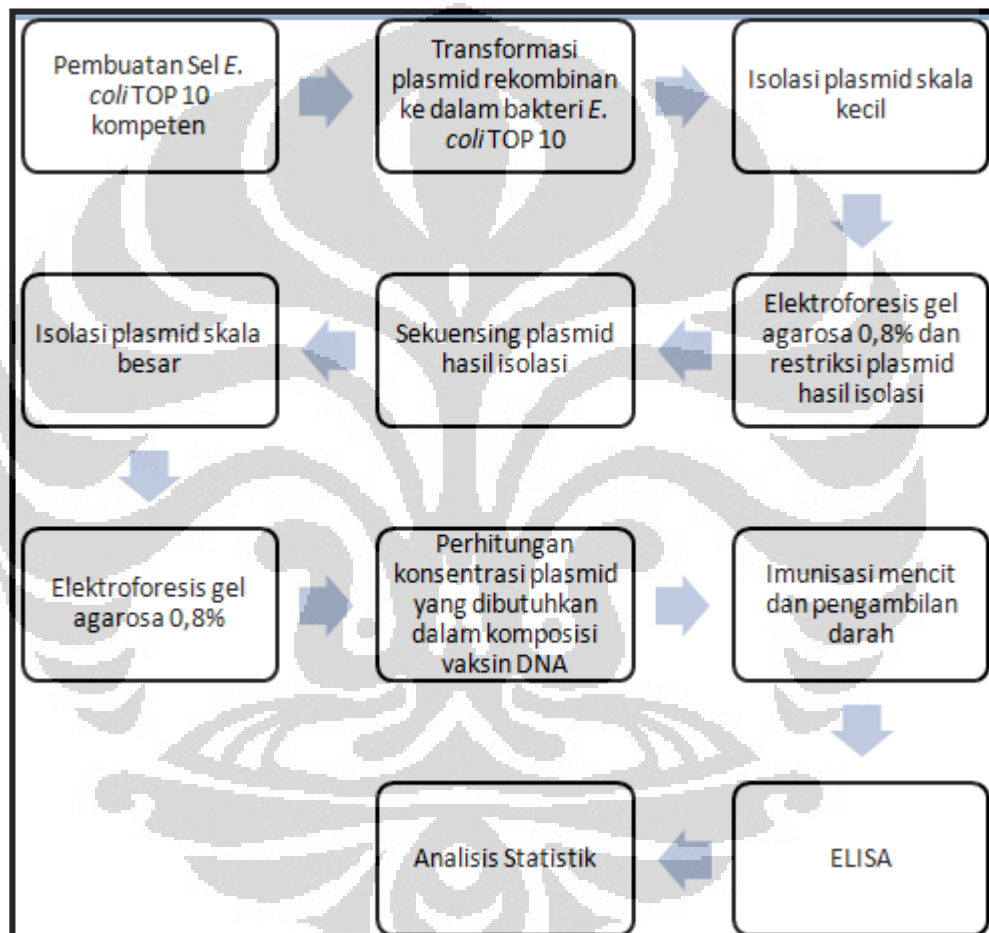
Komposisi vaksin DNA yang diuji terdiri atas pcDNA3.1HA-MPER2 yaitu DNA plasmid penyandi protein HA dimutasi situs 2 dengan penyisipan MPER (HA-MPER2), pcDNA3.1HA yaitu DNA plasmid penyandi protein HA dan sebagai kontrol digunakan pcDNA3.1(+) yaitu DNA plasmid yang tidak mengandung gen sisipan.

Plasmid rekombinan penyandi protein HA-MPER2 telah berhasil dikonstruksi pada penelitian sebelumnya (Agustian, 2012, *unpublish*), begitu juga dengan plasmid rekombinan penyandi protein HA telah berhasil dibuat pada penelitian terdahulu (Bela, 2011). Plasmid-plasmid rekombinan tersebut selanjutnya diperbanyak dengan melakukan transformasi pada bakteri *E. coli* TOP 10. Untuk melakukan verifikasi sebelum tahap isolasi skala besar, terlebih dahulu dilakukan isolasi skala kecil, elektroforesis dan sekuensing untuk memastikan bahwa hasil isolasi merupakan plasmid rekombinan yang diinginkan. Setelah didapatkan sekuens yang benar pada tahap sekuensing, selanjutnya dilakukan isolasi skala besar untuk mendapatkan plasmid rekombinan yang diinginkan dalam jumlah yang cukup untuk imunisasi pada mencit. Pada komposisi tiap-tiap vaksin DNA ditambahkan DMRIE-c yang merupakan lipofektamin untuk melindungi plasmid selama proses administrasi menuju sel target. Alur penelitian secara garis besar dapat dilihat pada Gambar 3.1.

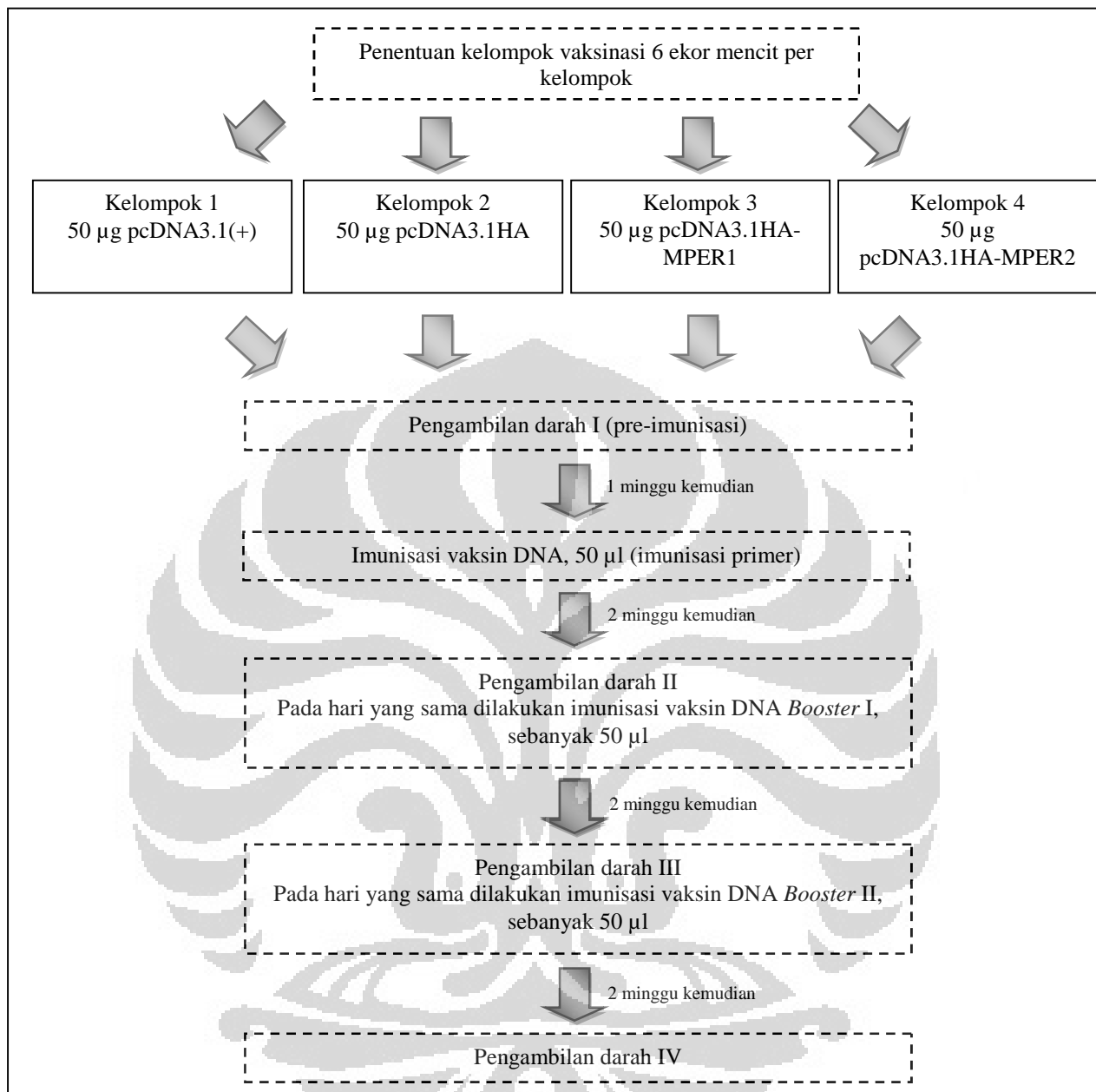
Imunisasi pada mencit dilakukan pada mencit galur BALB/c berumur 6-8 minggu. Penyuntikan dilakukan di otot *musculus quadriceps* dengan konsentrasi 50 µg/50 µl vaksin DNA. Penentuan jumlah mencit yang digunakan untuk setiap kelompok perlakuan dihitung berdasarkan rumus Federer. Imunisasi dilakukan 3

kali dengan rincian imunisasi *prime* dan dua kali imunisasi *booster*. Jarak waktu imunisasi adalah 2 minggu. Pengambilan darah dilakukan di *facial vein* pada 2 minggu sebelum imunisasi *prime* dan selanjutnya pada jarak waktu tiap 2 minggu setelah imunisasi. Kemudian pada darah yang diambil dilakukan sentrifugasi untuk diambil serumnya. Bagan imunisasi mencit dapat dilihat pada Gambar 3.2.

Adanya respon antibodi spesifik MPER-gp41 dalam serum dideteksi dengan uji ELISA.



Gambar 3.1 Rancangan alur penelitian



Gambar 3.2 Bagan Imunisasi Mencit

3.2. Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan di laboratorium IHVCB-UI (*Institute of Human Virology and Cancer Biology University of Indonesia*), Gedung IASTH Salemba, Jakarta Pusat selama bulan Maret sampai dengan Juni 2012.

3.3. Alat

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah mikropipet berbagai ukuran [Bio Rad], tip [Sorenson], tabung mikrosentrifus 1,5 ml [Axygen], tabung sentrifus 15 ml dan 50 ml [Nunc dan Corning], Erlenmeyer [Schott Duran], cawan petri [Normax], inkubator [inco 2], *microwave* [Sharp], inkubator goyang [Ratex Adelab Scientific], sentrifugator [Sorvall Biofuge Primo], *biosafety cabinet* [Esco], mesin *spinner* [Bio Rad], mesin *vortex* [Heidolph reaxtop], perangkat elektroforesis [Bio Rad], *timer* [Bio Rad], autoklaf [Hirayama], timbangan elektrik [Adventurer™ Ohaus], *waterbath* [N-Biotek], lemari pendingin [Sanyo], *freezer -20° C* [LG], mesin pembuat es [Hoshizaki], gelas ukur [Iwaki Pyrex], *scanner* [Canon], komputer [Samsung], sarung tangan [Sensi gloves], masker [Pro-mask], parafilm [Sigma], ELISA *reader* [Bio Rad], alat Nanodrop [Thermo Scientific], perangkat GelDoc [Bio Rad], syringe 1 ml [Thermo].

3.4. Bahan

3.4.1. Sel Bakteri

Bakteri yang digunakan untuk proses perbanyakan plasmid dalam penelitian ini adalah sel *Escherichia coli* TOP 10 karena bakteri ini memiliki tingkat efisiensi transformasi yang tinggi.

3.4.2. Plasmid Rekombinan

Plasmid rekombinan yang digunakan sebagai komposisi vaksin DNA HIV-1 pada penelitian ini yaitu plasmid pcDNA3.1HA dan plasmid pcDNA3.1HA-MPER2. Sedangkan sebagai kontrol digunakan plasmid pcDNA3.1(+) (*wildtype*) yakni plasmid yang tidak mengandung gen sisipan.

3.4.3. Hewan Uji

Hewan uji yang digunakan pada masing-masing kelompok berupa 6 ekor mencit (*Mus musculus*) galur BALB/c betina yang berumur 6-8 minggu. Mencit diperoleh dari UGM Jogjakarta. Penentuan jumlah mencit pada setiap kelompok dihitung berdasarkan rumus Federer :

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

dimana n menunjukkan jumlah ulangan minimal dari tiap perlakuan dan t menunjukkan jumlah perlakuan. Berikut perhitungan jumlah hewan uji yang digunakan dalam penelitian:

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

$$(n - 1)(4 - 1) \geq 15$$

$$(n - 1) 3 \geq 15$$

$$3n - 3 \geq 15$$

$$n \geq 6$$

Jadi, digunakan mencit dengan jumlah 6 ekor tiap kelompok. Perhitungan jumlah perlakuan menjadi 4 dengan rincian kelompok yang divaksinasi pcDNA3.1(+), pcDNA3.1HA, pcDNA3.1HA-MPER2 dan terakhir adanya penambahan perlakuan kelompok divaksinasi pcDNA3.1HA-MPER1. Perhitungan tersebut dimaksudkan untuk meminimalkan jumlah hewan coba yang digunakan. Dalam proses pengerjaan preparasi vaksin hingga vaksinasi hewan coba, pcDNA3.1HA-MPER1 dikerjakan oleh peneliti lain. Dalam penelitian ini, pcDNA3.1HA-MPER1 hanya akan digunakan oleh peneliti sebagai pembanding saat uji serologis dan dimasukkan dalam analisis statistik.

Selama pemeliharaan, hewan uji diperhatikan kesejahteraannya dengan diberikan makanan dan minuman secara *ad libitum*, dibersihkan kandang dan diganti alas kandang secara teratur setiap 3 hari sekali, dilakukan pengaturan suhu udara dan kelembaban dengan menyalakan penyejuk ruangan pada suhu 25⁰C selama 24 jam. Selain itu, untuk menjamin adanya pertukaran udara dari dalam kamar hewan dengan luar kamar hewan dinyalakan *Exhaust Fan* (kipas pengatur aliran udara).

3.4.4. Medium

Medium yang digunakan untuk kultur dalam penelitian adalah medium Luria Bertani broth [Himedia Laboratories Pvt. Ltd], Luria Bertani agar [Himedia Laboratories Pvt. Ltd] dan medium SOC [Invitrogen].

3.4.5. Primer untuk Sekuensing

Terdapat dua primer yang digunakan untuk sekuensing DNA gen HAMPER2 dalam pcDNA3.1(+) digunakan primer H327F dan H688R.

3.4.6. Bahan Kimia

Bahan kimia yang digunakan dalam penelitian ini adalah aquades, Ampisilin [Viccilin], Natrium klorida [Merck], Tripton [Bio Basic Inc.], *Phosphate buffer saline* (PBS) [Gibco], Natrium hidroksida [Merck], Asam klorida [Merck], Dinatrium edetat [Merck], Asam asetat glasial [Merck], gliserol [Promega], sodium dodesil sulfat (SDS) [Promega], etidium bromida [Promega], *o-phenylenediamine* (OPD) [Sigma], Isopropanol [Merck], Natrium asetat [Merck], Asam sulfat [Merck], Etanol [Merck], Asam sitrat [Sigma], Asam karbonat [Sigma], Asam bikarbonat [Sigma], *Tris base* [Promega], Tween-20 [Sigma], Streptavidine-HRP [Chemicon], gelatin [Bio Rad], IgG antimice antibodi berlabel biotin, dan peptida ELDKWAS [1st Base].

3.4.7. Enzim untuk Restriksi

Enzim yang digunakan untuk restriksi plasmid adalah HindIII [Fermentas] dan BamHI [NEB].

3.5. Cara Kerja

3.5.1. Pembuatan larutan, medium, dan larutan penyangga

Berikut ini merupakan cara pembuatan larutan, medium dan *buffer* yang akan digunakan selama penelitian (Ausubel, dkk., 1990; Sambrook & Russell, 2001; Qiagen)

3.5.1.1. Medium LB (Luria Bertani) Cair

Medium LB cair dibuat dengan komposisi tripton, *yeast extract*, NaCl dan aquades. Pembuatan diawali dengan pencampuran 10 g tripton, 5 g *yeast extract* dan 10 g NaCl, lalu dilarutkan dengan aquades steril hingga volume 1 liter. Campuran dihomogenkan dengan bantuan *magnetic stirrer*. Setelah larut

sempurna, campuran disterilisasi dengan autoklaf pada 121°C, tekanan 1 atm, selama 20 menit.

3.5.1.2. Medium LB Agar

Medium LB agar dibuat dengan melarutkan 4 gram serbuk LB Agar ke dalam 100 ml aquades, Campuran dihomogenkan dengan bantuan *magnetic stirrer*. Setelah larut sempurna, campuran disterilisasi dengan autoklaf pada 121°C, tekanan 1 atm, selama 20 menit.

3.5.1.3. Ampisilin 100 µg/µl

Larutan stok ampisilin dibuat dengan konsentrasi 50 mg/ml dalam aquades dan disimpan pada suhu -20°C. Sedangkan untuk pemakaian, larutan stok diencerkan hingga didapatkan 100 µg/ml (1/500). Sebelum penambahan antibiotik ke medium yang baru di-autoklaf, suhu medium dipastikan telah didinginkan hingga dibawah 50°C.

3.5.1.4. Buffer P1 (TE 1x)

Komposisi dari larutan penyangga P1 terdiri dari 6,06 g g Tris base dan 3,72 g Na₂EDTA-2H₂O dilarutkan dalam 800 ml aquades. Kemudian dilakukan penyesuaian pH 8 dengan HCl, lalu volume dibuat 1 liter dengan penambahan aquades. Sebelum penggunaan, ditambahkan 100 mg RNase A per liter larutan P1 yang telah dibuat.

3.5.1.5 Buffer P2 (NaOH-SDS)

Sebanyak 8,0 gr pelet NaOH dilarutkan dalam 950 ml aquades dan 50 ml larutan SDS 20% (w/v).

3.5.1.6 Buffer 50x TAE

Sebelum penggunaan larutan penyangga ini sebagai pereaksi pada elektroforesis, dibuat terlebih dahulu larutan stok-nya. Larutan stok larutan penyangga 50x TAE per liter terdiri dari 242 g Tris base, 57,1 ml asam asetat glasial dan 0,5 M EDTA pH 8 sebanyak 100 ml.

3.5.1.7 PBS-Tween

Sebanyak 500 µl Tween-20 dicampurkan ke dalam 1 liter PBS 1x.

3.5.1.8 Coating buffer pH 9,6

Larutan ini dibuat dari 0,15 M natrium karbonat 5,86 g, 0,35 M natrium bikarbonat 3,18 g dan 0,03 M natrium azida 0,4 g yang dilarutkan dalam aquades steril hingga volumenya 200 ml.

3.5.1.9 Larutan Pengeblok

Larutan ini dibuat dari 1 g gelatin yang dilarutkan dalam 100 ml PBS 1x.

3.5.1.10 Larutan Pengencer

Pembuatan larutan ini dengan dilarutkannya 1,5 gr gelatin dalam PBS 1x.

3.5.1.11 Substrat OPD

Substrat OPD dibuat dari 2,6 g natrium sitrat dan 6,9 g Na_2HPO_4 yang dilarutkan dalam 50 ml aquades steril lalu dicampurkan 50 mg OPD dan 1,2 ml H_2O_2 3%.

3.5.2 Preparasi vaksin DNA HA-MPER2 HIV-1

3.5.2.1 Pengkulturan *E. coli* Top 10 dari Stok Kultur

Pengkulturan diawali dengan pengambilan satu ose bakteri dalam stok kultur, kemudian dilakukan penggoresan pada media LB agar tanpa penambahan ampisilin. Setelah itu, dilakukan inkubasi dalam inkubator bersuhu 37°C selama 16 jam (*overnight*). Selama inkubasi, cawan petri diletakkan terbalik yakni posisi agar berada di bagian atas.

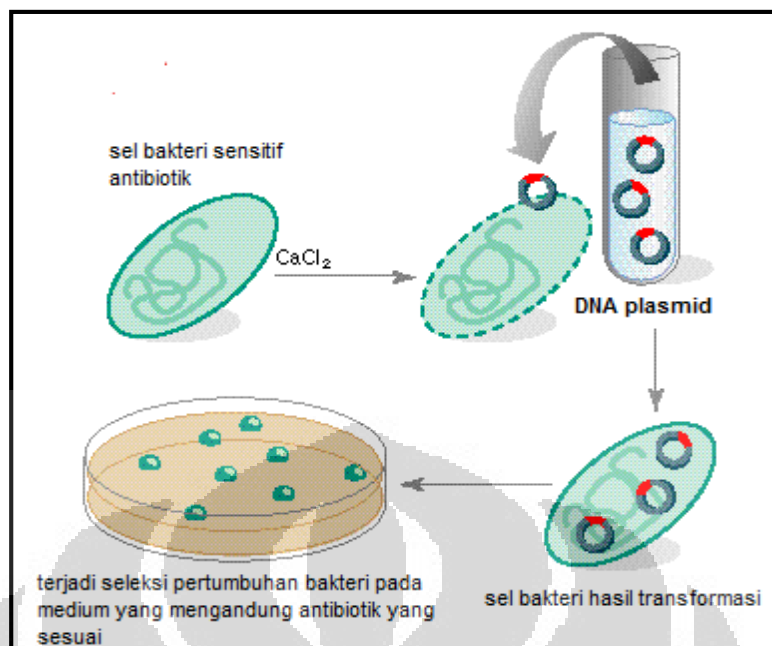
3.5.2.2 Persiapan Pembuatan Sel *E. coli* TOP 10 Kompeten

Persiapan dimulai dengan membuat replika dari empat koloni terpilih pada kultur *E. coli* TOP 10 yang telah dibuat di hari sebelumnya. Replika dibuat pada LB agar tanpa ampisilin. Kemudian dibuat kultur semalam dari empat koloni tersebut dengan melakukan inokulasi tiap koloni *E. coli* ke dalam 4 ml LB cair

yang ditambah ampisilin (1: 1000) dan 4 ml LB cair tanpa penambahan ampisilin. Pembuatan kultur semalam dalam LB cair dengan ampisilin dimaksudkan sebagai kontrol, dimana dalam media tersebut seharusnya *E. coli* TOP 10 tidak dapat tumbuh. Hasil replika diinkubasi selama 16 jam dalam inkubator dengan suhu 37°C. Sedangkan kultur semalam dalam diinkubasi dalam inkubator goyang bersuhu 37°C dengan kecepatan 200 rpm selama 16 jam.

3.5.2.3 Pembuatan *E. coli* Top 10 Kompeten dan Transformasi

Pembuatan sel bakteri kompeten bertujuan untuk membuat bakteri dapat menangkap DNA bebas di luar sel. Penggambaran proses sel bakteri menjadi kompeten dapat dilihat pada gambar 9, dimana penggunaan kalsium dengan konsentrasi tinggi dalam pembuatan sel kompeten menyebabkan dinding sel bakteri memiliki celah. Kemudian DNA bebas yang berada di luar sel dapat masuk ke dalam sel bakteri ketika terjadi perubahan suhu lingkungan secara tiba-tiba, dari suhu rendah ($\sim 0^{\circ}\text{C}$) ke suhu 37-42°C dan dikembalikan lagi ke suhu rendah. Proses memasukkan DNA ke dalam sel bakteri yang kompeten dikenal sebagai transformasi. Bakteri yang telah kompeten dan melalui tahap transformasi selanjutnya dapat ditanam dengan cara disebar pada media padat yang mengandung agen penyeleksi. Untuk agen penyeleksi pcDNA3.1(+) digunakan ampisilin dengan perbandingan 1:1000 dalam media LB cair dan 1:2000 dalam media LB agar. Ada tidaknya pertumbuhan dapat dijadikan indikator keberhasilan transformasi.

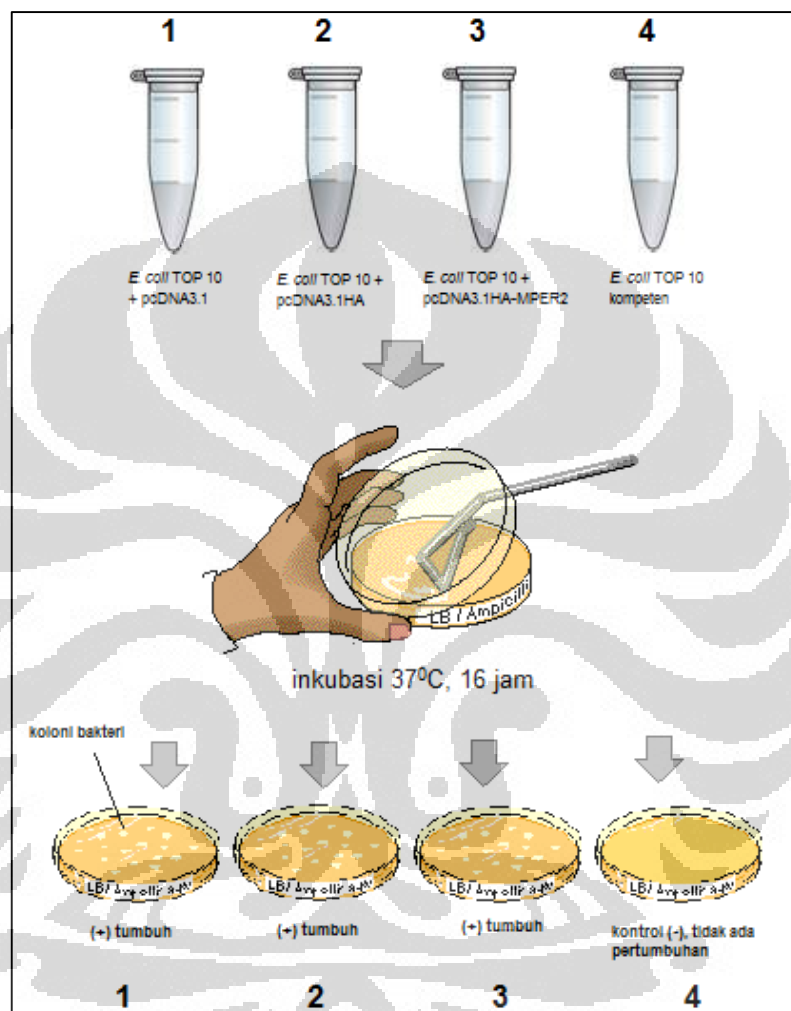


[sumber: The National Health Museum, 2009, telah diolah kembali]

Gambar 3.3 Proses kompeten dan transformasi plasmid ke dalam sel bakteri

Sel kompeten dan transformasi dilakukan berdasarkan metode Sambrook & Russell (2001). Pembuatan sel kompeten diawali dengan dibiakkannya kultur semalam *E. coli* TOP 10, yang dibuat di hari sebelumnya, dalam media LB cair 20 ml (perbandingan 1/200). Kemudian campuran dikocok selama 2 jam dalam inkubator goyang bersuhu 37°C dengan kecepatan 200 rpm. Setelah itu, dilakukan inkubasi dalam es selama 1 jam lalu disentrifugasi selama 10 menit dengan kecepatan 3500 rpm pada suhu 4°C. Setelah tahap ini, semua peralatan yang digunakan harus dingin, diantaranya tabung sentrifus, tip dan larutan. Pada kultur yang telah disentrifugasi, supernatan dibuang dan pelet disuspensikan dalam 1/5 volume 0,1 M MgCl₂ dingin. Suspensi kembali diinkubasi dalam es selama 10-15 menit, lalu disentrifugasi selama 10 menit dengan kecepatan 3500 rpm pada suhu 4°C. Supernatan dibuang dan pelet disuspensikan dalam 0,1 M CaCl₂ dingin sebanyak 1/50 volume suspensi. Suspensi kembali diinkubasi dalam es selama 60 menit, lalu disentrifugasi selama 10 menit dengan kecepatan 3500 rpm pada suhu 4°C. Supernatan dibuang, kemudian pelet disuspensikan dalam 200 µl CaCl₂ 0,1 M dingin. Suspensi kemudian dialiokot masing-masing 50 µl ke dalam 4 tabung 1,5 ml, dengan rincian sebagai berikut :

- Tabung 1 : 50 μ l sel bakteri kompeten + 1 μ l pcDNA3.1
- Tabung 2 : 50 μ l sel bakteri kompeten + 1 μ l pcDNA3.1HA
- Tabung 3 : 50 μ l sel bakteri kompeten + 1 μ l pcDNA3.1HA-MPER2
- Tabung 4 : kontrol (-), hanya berisi 50 μ l sel *E. coli* TOP 10 kompeten



Gambar 3.4. Bagan cara kerja transformasi pcDNA3.1(+), pcDNA3.1HA dan pcDNA3.1HA-MPER2 ke dalam bakteri *E. coli* TOP 10

Masing-masing tabung 1,5 ml tersebut diinkubasi dalam es selama 1 jam, lalu dilakukan proses transformasi dengan *heatshock* dalam penangas air (*waterbath*) 38°C selama tepat 90 detik. Setelahnya tiap-tiap tabung dengan segera diinkubasi kembali dalam es selama 60 detik, lalu ditambahkan medium SOC masing-masing 200 μ l. Inkubasi kembali dilakukan setelah penambahan

media, selama 1 jam dalam inkubator goyang pada 37°C dengan kecepatan 200 rpm.

Pada gambar 3.4 dapat dilihat kultur yang telah diinkubasi, kemudian masing-masing disebar diatas medium padat LB agar yang telah diberi ampisilin (perbandingan 1:2000) dengan bantuan *spreader* dan diinkubasi selama 16 jam pada suhu 37°C. Pada hasil inkubasi diharapkan pada medium nomer 1-3 terjadi pertumbuhan yang mengindikasikan keberhasilan transformasi, sedangkan pada medium nomer 4 sebagai kontrol negatif tidak terjadi pertumbuhan.

3.5.2.4. Pembuatan Replika Kultur

Sebelum dilakukan replika kultur, dilakukan pemeriksaan terlebih dahulu terhadap hasil transformasi yang telah dilakukan sebelumnya untuk mengetahui adanya pertumbuhan koloni bakteri. Selanjutnya dilakukan pemilihan koloni bakteri yang akan ditanam pada medium LB agar dengan ampisilin untuk replika dan dibiakkan dalam medium LB cair dengan ampisilin sebagai kultur semalam. Replika diinkubasi 37°C selama 16 jam, sedangkan kultur semalam dalam LB cair diinkubasi dalam inkubator goyang dengan kecepatan 200 rpm, suhu 37°C selama 16 jam. Pembuatan kultur semalam dilakukan untuk selanjutnya digunakan pada tahap isolasi plasmid skala kecil.

3.5.2.5 Isolasi Plasmid Skala Kecil

Prosedur isolasi plasmid skala kecil dilakukan berdasarkan metode alkali-lisis SDS (Ausubel et al, 1990) dengan menggunakan Qiaspin Miniprep Kit [Qiagen] yang telah dimodifikasi. Isolasi plasmid skala kecil perlu dilakukan dengan tujuan untuk melakukan verifikasi terhadap DNA hasil isolasi, baik menggunakan elektroforesis gel agarosa 0,8% maupun sekuensing. Jika hasil verifikasi DNA hasil isolasi telah sesuai dengan yang diinginkan, selanjutnya baru akan dilakukan isolasi skala besar. Isolasi skala besar ditujukan untuk mendapatkan jumlah DNA yang cukup untuk imunisasi hewan coba.

Persiapan isolasi plasmid dilakukan sehari sebelum pelaksanaan isolasi yakni dengan menyiapkan kultur semalam bakteri hasil transformasi dalam LB cair. Kultur bakteri yang telah diinkubasi selama 16 jam dalam LB cair

disentrifugasi selama 1 menit dengan kecepatan 12000 rpm (jika menggunakan tabung 1,5 ml) atau selama 10 menit dengan kecepatan 3500 rpm (jika menggunakan tabung sentrifus 15 ml). Supernatan pada suspensi dibuang, pelet disuspensikan dalam 125 μ l larutan P1 (yang telah mengandung 100 μ g/ml RNase A) lalu dikocok dengan vortex hingga pelet tercampur homogen dalam P1. Larutan P2 sebanyak 125 μ l ditambahkan ke dalam suspensi pelet sebelumnya, lalu tabung dibolak-balik perlahan sebanyak 7 kali. Larutan N3 ditambahkan sebanyak 175 μ l dan tabung segera dibolak-balik perlahan 7 kali. Pada tahap ini, larutan akan tampak berawan. Kemudian larutan disentrifugasi dengan kecepatan 12000 rpm selama 10 menit. Selama menunggu proses sentrifugasi, disiapkan kolom biru untuk isolasi. Pada larutan yang telah disentrifugasi, supernatan yang mengandung lisat sel dipindahkan ke kolom biru. Kolom biru yang digunakan telah dilengkapi dengan tabung penampung dibawahnya sebagai perangkat alat pengisolasi. Kolom disentrifugasi dengan kecepatan 12000 rpm selama 1 menit. Lisat yang ada di tabung penampung dimasukkan kembali ke dalam kolom biru dan ulangi lagi langkah sebelumnya. Selanjutnya lisat yang ada di tabung penampung dibuang dan kolom dicuci dengan 100 μ l PB agar DNA terikat dengan membran, lalu disentrifugasi selama 1 menit dengan kecepatan 12000 rpm. Eluen yang ada dalam tabung penampung dibuang. Lalu dilakukan penambahan 120 μ l campuran larutan PE dengan etanol absolut (perbandingan 1:4) dan disentrifugasi kembali dengan kecepatan 12000 rpm selama 1 menit sebanyak dua kali untuk menghilangkan etanol yang mungkin masih tersisa. Eluen yang ada di tabung penampung dibuang kembali. Kemudian kolom biru bagian atas dipindahkan ke tabung 1,5 ml baru dan ditambahkan ke dalamnya 20 μ l 1/3 EB untuk melulusi plasmid yang terikat pada membran kolom, inkubasi 3 menit pada suhu ruang lalu disentrifugasi dengan kecepatan 12000 rpm selama 1 menit. Selanjutnya ditambahkan 10 μ l 1/3 EB ke dalam kolom, inkubasi di suhu ruang selama 5 menit dan disentrifugasi dengan kecepatan 12000 rpm selama 1 menit. Kolom biru dipindahkan dan pada tahap ini plasmid dalam tabung dapat disimpan dalam suhu -40°C . Untuk melakukan verifikasi setelah isolasi, terlebih dahulu dilakukan analisis nanodrop untuk mengetahui konsentrasi DNA yang berhasil diisolasi dalam satuan ng/ μ l. Jika

konsentrasi DNA tinggi, sebelum restriksi DNA dilakukan pengenceran hingga konsentrasi mencapai 40-50 ng/ μ l.

3.5.2.6. Restriksi Plasmid

Teknik analisis hasil isolasi plasmid untuk verifikasi dilakukan berdasarkan metode Sambrook (1989) yakni dengan restriksi DNA rekombinan. Restriksi dilakukan untuk membuat plasmid menjadi bentuk linier, sehingga dapat ditentukan ukurannya dengan membandingkan pola migrasi plasmid linier dengan marka *gene ruler* yang telah diketahui panjangnya.

Restriksi dilakukan dengan melakukan inkubasi plasmid yang akan dianalisis dengan enzim pada kondisi tertentu. Komposisi reaksi restriksi terdiri dari: 7 μ l H₂O [Sigma], 2 μ l buffer R [Fermentas], 0,5 μ l enzim HindIII [Fermentas] dan 2 μ l plasmid. Setelah itu, dilakukan inkubasi selama 3 jam dalam inkubator 37°C. Hasil restriksi dapat dianalisis dengan melakukan elektroforesis gel agarosa 0,8%.

3.5.2.7. Elektroforesis Gel Agarosa

Elektroforesis gel agarosa dilakukan untuk analisis DNA hasil isolasi berdasarkan ukuran DNA. Konsentrasi gel agarosa yang digunakan sebesar 0,8%. DNA hasil isolasi yang mengandung gen sisipan akan bermigrasi dalam gel lebih lambat dibandingkan DNA yang tidak mengandung gen sisipan. Hal tersebut terkait dengan ukuran DNA (plasmid) yang dianalisis, dimana plasmid rekombinan akan memiliki ukuran yang lebih besar dibandingkan plasmid *wildtype*.

Elektroforesis gel agarosa dilakukan berdasarkan metode Sambrook (1989) diawali dengan dibuatnya gel agarosa konsentrasi 0,8% (0,8 gram agarosa dalam 100 ml 0,5x TAE) dalam cetakan. Kemudian gel yang telah dicetak, diletakkan ke dalam wadah elektroforesis yang telah berisi 0,5x TAE. Sebanyak 5 μ l DNA yang akan dianalisis, ditambahkan dengan 1 μ l 6x *loading dye* (perbandingan 5:1). Sampel yang telah dicampur *loading dye* dimasukkan ke dalam sumur-sumur pada gel agarosa 0,8% dan dielektroforesis selama 30 menit pada 100 V. Gel agarosa direndam dalam larutan etidium bromida selama 5-10

menit untuk mewarnai DNA, kemudian dicuci dalam larutan penyangga 0,5x TAE selama 15 menit. Selanjutnya hasil elektroforesis dapat dilihat dengan bantuan alat *UV-transilluminator*, lalu didokumentasikan dengan alat Gel-Doc [BioRad].

3.5.2.8. Sekuensing

Sekuensing dilakukan untuk mengetahui sekuens yang terdapat dalam plasmid hasil isolasi skala kecil. Pada penelitian ini, tahap sekuensing dilakukan oleh staf IHVCB-UI. Primer yang digunakan untuk sekuensing plasmid pcDNA3.1HA-MPER2 yakni H688R dan H327F. Reaksi sekuensing DNA dilakukan dengan reaksi sesuai protokol *AppliedBiosystem*. Pada hasil sekuensing diharapkan adanya sekuens-sekuens yang sesuai dengan plasmid yang telah diisolasi.

3.5.2.9. Isolasi Plasmid Skala Besar

Untuk isolasi plasmid skala besar digunakan Qiaprep Spin Maxiprep Kit [Qiagen] dan prosedur kerja dilakukan berdasarkan protokol dari kit tersebut yang telah dimodifikasi. Tahap isolasi plasmid skala besar dilakukan setelah melalui tahap sekuensing dan mendapatkan hasil isolat yang tepat. Tahap ini dimulai dengan dilakukannya *streak* pada medium LB agar untuk replika dan dimasukkan ke dalam 1 liter LB cair, yang telah mengandung ampisilin, sebagai kultur semalam yang akan diisolasi plasmid. Pada pembuatan kultur semalam dilakukan pengocokan selama 16 jam (*overnight*) dengan suhu 37°C. Kemudian kultur semalam dibagi ke dalam 4 tabung sentrifugasi, lalu disentrifugasi dengan kecepatan 9500 rpm selama 10 menit. Supernatan dibuang dan ulangi langkah sebelumnya hingga kultur habis. Pelet yang terbentuk dilarutkan dalam 12 ml larutan P1 (telah ditambahkan RNase A) lalu dikocok dengan vortex dan dipindahkan ke dalam tabung sentrifugasi 50 ml. Pada tabung selanjutnya ditambahkan 12 ml larutan P2 dan dibolak-balik sebanyak 8 kali. Berikutnya ditambahkan 12 ml larutan P3 dingin dan dengan segera dibolak-balik sebanyak 8 kali. Supernatan diambil dan dimasukkan ke dalam suntikan. Sebelumnya bagian bawah suntikan ditutup dengan penutup yang tersedia agar lisat tidak menetes. Inkubasi dilakukan setelahnya selama 10 menit. *Plunger* pada suntikan dipasang

dan digunakan untuk mendorong cairan hasil inkubasi tadi agar menetes keluar dari suntikan yang penutup bawahnya telah dilepaskan. Pada tahap ini akan didapatkan cairan jernih yang ditampung dalam tabung baru, lalu diinkubasi dalam es selama 30 menit.

Selama menunggu inkubasi, dilakukan pengaktifan membran resin dalam Qiafilter dengan ditambakkannya 10 ml larutan QBT. Setelah seluruh larutan QBT melewati resin, hasil tampungannya dalam tabung dibuang. Bagian atas Qiafilter ditutup parafilm untuk menghindari kontaminasi. Cairan hasil inkubasi dalam es tadi, dimasukkan ke dalam Qiafilter hingga habis dan dibiarkan hingga seluruhnya menetes. Hasil tetesan cairan ditampung ke dalam tabung baru. Prosedur diulangi satu kali lagi agar DNA terikat semua pada resin.

Larutan QC yang dibutuhkan untuk mencuci DNA ditambahkan ke dalam Qiafilter sebanyak 10 ml. Ulangi pencucian satu kali lagi. Qiafilter dipindahkan ke tabung baru, kemudian DNA dilarutkan dengan 6 ml QN yang telah dipanaskan pada suhu 65°C. Pada tahap ini, DNA telah berada dalam cairan dalam tabung. Selanjutnya 14 ml isopropanol dan 2 ml natrium asetat 3M ditambahkan ke dalamnya, lalu larutan dipindahkan secara aliquot masing-masing ke dalam tabung eppendorf 1,5 ml. Setelahnya, disentrifugasi selama 30 menit dengan kecepatan 12000 rpm. Supernatan dibuang tidak dengan bantuan pipet. Pelet dicuci dengan 300 µl etanol 70% dan disentrifugasi kembali selama 30 menit dengan kecepatan 12000 rpm. Selanjutnya supernatan dibuang dan DNA dikeringkan dengan ditematkannya eppendorf pada *heatblock* yang bersuhu 50-55°C. Setelah pelet benar-benar kering, disimpan dalam *freezer* -40°C. Satu pelet eppendorf yang dilarutkan dengan 20 µl PBS, diambil dan diinkubasi dalam suhu kamar 10-15 menit. Kemudian pelet tersebut dikocok dengan vortex. Analisis nanodrop dilakukan untuk mengukur konsentrasi DNA dengan mengambil 1 µl. Jika konsentrasi DNA hasil nanodrop tinggi, dilakukan pengenceran terlebih dahulu terhadap DNA hasil isolasi dengan PBS hingga konsentrasi mencapai 40-50 ng/µl sebelum dilakukan verifikasi dengan elektroforesis gel agarosa. Selain itu, hasil analisis nanodrop juga digunakan untuk melakukan perhitungan total jumlah DNA yang dibutuhkan untuk imunisasi hewan coba.

Plasmid yang telah berhasil diisolasi, dapat disimpan pada suhu -40°C sebelum digunakan untuk imunisasi mencit.

3.5.3 Perhitungan Konsentrasi Vaksin DNA untuk Imunisasi

Komponen yang terkandung dalam ketiga vaksin DNA yang digunakan dalam penelitian ini selain plasmid rekombinan (kecuali pcDNA3.1 *wildtype*) yaitu DMRIE-c. DMRIE-c merupakan lipofektamin yang berfungsi sebagai pelindung DNA plasmid sebagai komponen utama vaksin. Konsentrasi lipofektamin dalam vaksin DNA ini dihitung dengan perbandingan molar 1:2 (DNA:lipofektamin). Sedangkan berat molekular DNA diketahui dengan melakukan perhitungan sebagai berikut: $(\text{Jumlah nukleotida} \times 607.4) + 157.9$ (Life Technologies Corporation, 2012).

Perhitungan diawali dengan menghitung berat molekular plasmid rekombinan dengan rumus yang telah diketahui diatas untuk mengetahui molaritas (M) dari tiap plasmid hasil isolasi. Kemudian dilakukan perhitungan jumlah DMRIE-c yang dibutuhkan dengan perbandingan molar (1:2). Untuk massa dan volume plasmid dapat disesuaikan dengan jumlah yang dibutuhkan, misal untuk 1 mencit dibutuhkan plasmid $50 \mu\text{g}/50 \mu\text{l}$. Untuk melarutkan DNA hasil isolasi digunakan PBS (*Phosphate Buffer Saline*).

3.5.4 Imunisasi

Imunisasi mencit BALB/c betina yang berumur 6-8 minggu dilakukan secara intramuskular pada bagian *quadriceps*. Pada penelitian ini, kelompok mencit yang diimunisasi vaksin pcDNA3.1 digunakan sebagai kontrol negatif. Berikut konsentrasi vaksin yang digunakan :

- a. Kelompok I : pcDNA3.1 $50 \mu\text{g}$
- b. Kelompok II : pcDNA3.1-HA $50 \mu\text{g}$
- c. Kelompok III : pcDNA-HA-MPER-2 $50 \mu\text{g}$

Sebelum dilakukan perlakuan, hewan coba diadaptasikan terlebih dahulu dalam laboratorium penelitian selama 1 minggu. Selama pemeliharaan diperhatikan kesejahteraan hewan dengan memberikan makanan dan minuman secara *ad libitum*; tempat minum, kandang dan alasnya dibersihkan secara berkala

setiap 3-4 hari sekali; pengaturan suhu udara 25°C selama 24 jam; ruangan dilengkapi *Exhaust Fan* untuk pengaturan aliran udara dari dalam ruangan hewan dengan udara luar.

Vaksinasi dilakukan secara berkala dan 1 minggu sebelum hewan diimunisasi dilakukan pengambilan darah ke-1 atau pre-imunisasi. Pengambilan darah ke-2 dilakukan 2 minggu setelah imunisasi pertama (*prime*). Imunisasi kedua (*booster 1*) dilakukan pada minggu ke-3 setelah pengambilan darah ke-2. Kemudian, imunisasi ketiga (*booster 2*) dilakukan pada minggu ke-5 setelah pengambilan^{darah} ke-3. Terakhir dilakukan pengambilan darah ke-4 pada minggu ke-7. Jadi, total dilakukan imunisasi sebanyak tiga kali dan pengambilan darah sebanyak 4 kali.

Pengambilan darah dilakukan pada pembuluh darah vena superficial temporalis di mandibula sebanyak 0,15 ml. Sebelum dilakukan pengambilan darah dilakukan sterilisasi daerah mandibula dengan alkohol 70%. Lancet digunakan untuk mengambil darah dan darah ditampung dalam tabung 1,5 ml steril. Darah kemudian diinkubasi selama 2 jam di lemari es, lalu disentrifugasi dengan kecepatan 5000 rpm selama 15 menit. Supernatan yang diambil adalah serum dan dipindahkan ke dalam tabung mikrosentrifugasi 1,5 ml baru dan steril yang telah berisi gliserol 70% (perbandingan 1:1), lalu disimpan pada -80°C untuk perlakuan lebih lanjut.

3.5.5 ELISA

Prosedur pengujian serologis dengan metode ELISA diawali dengan dilakukannya pengenceran berseri dari peptida ELDKWAS sebagai antigen mulai dari 100 µg/ml, 50 µg/ml, 25 µg/ml dan 12,5 µg/ml dengan *coating buffer*, kemudian dimasukkan pada sumur ELISA sebanyak 50-60 µl (antigen pelapis) dan diinkubasi pada suhu 4°C selama semalam. Selanjutnya, pelat dicuci dengan 100 µl *buffer* pencuci (PBS 1x-Tween 20) untuk menghilangkan sisa antigen yang tidak menempel pada pelat. Antigen diblok dengan penambahan *buffer* pengeblok sebanyak 80 µl, lalu diinkubasi pada inkubator dengan suhu 37°C selama 1 jam dan pelat dicuci kembali sebanyak 3 kali dengan 80 µl *buffer* pencuci. Serum antibodi I (berasal dari mencit yang telah diimunisasi) diencerkan berseri

konsentrasinya menjadi 1/100, 1/50, 1/25 dan 1/12,5 dalam *buffer* pengencer (berisi 0,1% gelatin dalam PBS 1x), kemudian dimasukkan ke dalam masing-masing sumur ELISA sebanyak 50 μ l dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 1 jam. Pencucian sebanyak tiga kali kembali dilakukan dengan PBS-Tween.

Prosedur dilanjutkan dengan ditambahkan 50 μ l antibodi II (antibodi *anti-mouse* berlabel biotin) yang mengenali IgG mencit dengan pengenceran 1/5000, kemudian pelat diinkubasi pada suhu 37°C selama 1 jam dan dilakukan pencucian kembali setelahnya sebanyak tiga kali dengan PBS-Tween. Pada tiap sumuran, ditambahkan larutan streptavidin-HRP sebanyak 50 μ l dengan pengenceran 1/10000 dalam PBS 1x dan pelat diinkubasi pada suhu 37°C selama 1 jam lalu dicuci sebanyak tiga kali dengan PBS-Tween. Terakhir, dimasukkan 50 μ l substrat OPD (*ortho-phenylenediamine dihydrochloride*) pada masing-masing sumuran lalu didiamkan selama 5-15 menit dan ditambahkan 2,5M H₂SO₄ sebanyak 25 μ l untuk menghentikan reaksi (sebagai *stop solution*). Selanjutnya pengukuran OD (*optical density*) dari reaksi antigen-antibodi diukur dengan ELISA *reader* pada panjang gelombang (λ) 490 nm.

3.5.6 Analisis Data

Analisis data dengan uji statistik dilakukan pada hasil pengujian respon antibodi spesifik dalam serum hewan coba terhadap peptida ELDKWAS. Respon antibodi spesifik tersebut berdasarkan pada nilai OD pada uji ELISA. Data reaktivitas serum dicatat dan dimasukkan dalam tabel dan setelah dipastikan kelengkapannya dianalisis dengan uji statistik. Analisis data dilakukan menggunakan piranti lunak SPSS19.

Uji statistik yang digunakan untuk melihat perbandingan perbedaan masing-masing perlakuan terhadap kadar antibodi adalah ANOVA. Jika data tidak terdistribusi normal, uji statistik yang digunakan untuk melihat adanya perbedaan kadar antibodi dilakukan dengan uji Kruskal Wallis.

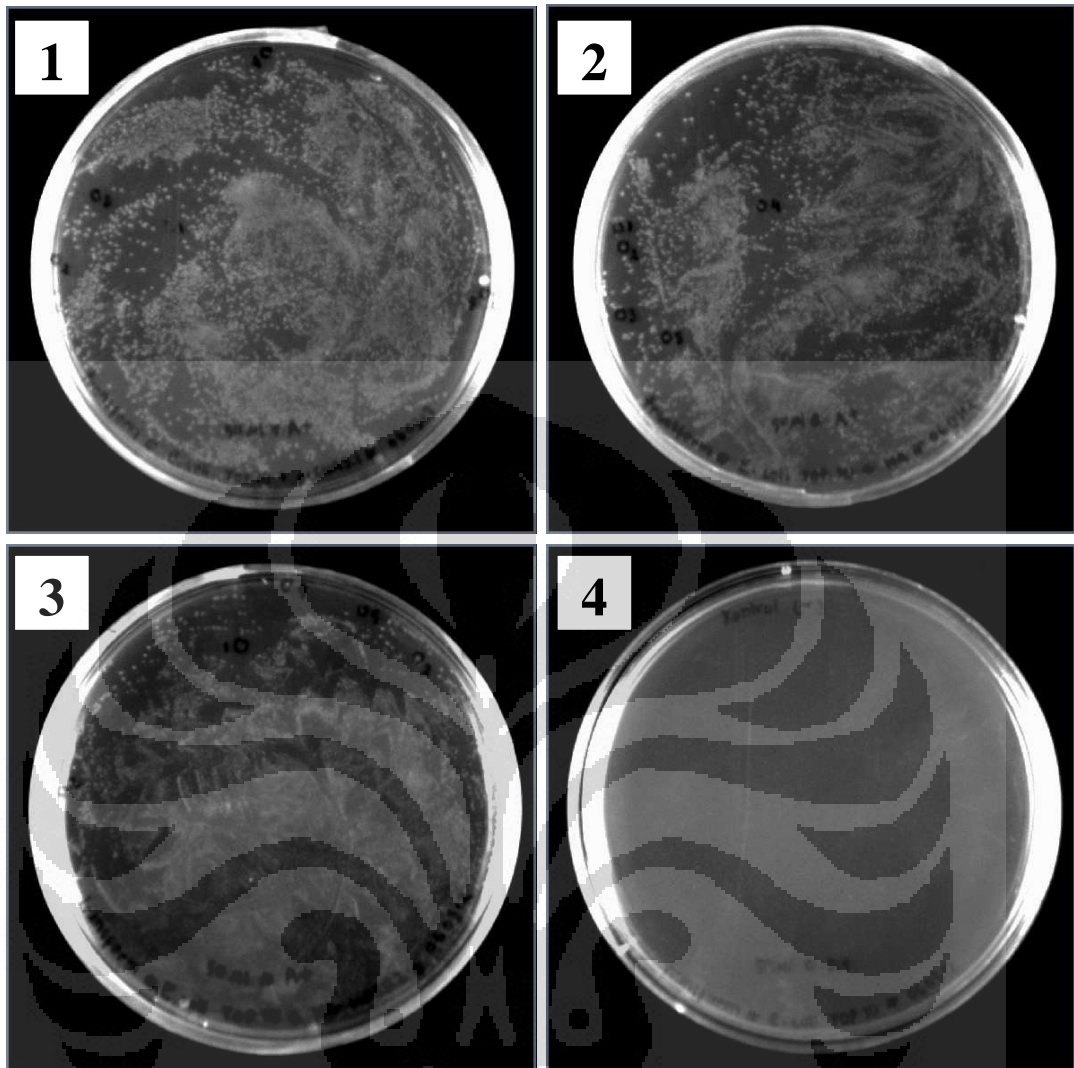
BAB 4

HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Pembuatan Sel Bakteri Kompeten dan Transformasi

Sel bakteri yang dibuat kompeten ditujukan untuk menjadikan suatu sel bakteri mampu menangkap DNA asing ke dalam selnya. Metode yang digunakan dalam membuat sel kompeten yaitu dengan mensuspensikan bakteri ke dalam larutan CaCl_2 (Sambrook & Russel, 2001: 1.116-1.118). Metode tersebut dipilih karena relatif cepat dan mudah dilakukan dengan efisiensi transformasi yang cukup tinggi yaitu 5×10^6 hingga 2×10^7 koloni/ μg DNA plasmid (Sambrook & Russel, 2001).

Pemaparan CaCl_2 pada sel bakteri ditambah adanya kejutan suhu (*heatshock*) yang berubah drastis dalam waktu singkat dapat menginduksi keadaan kompetensi sementara (permeabilitas bakteri meningkat) sehingga memungkinkan terjadinya transformasi DNA plasmid dari luar sel ke dalam sel. Pada penelitian telah dilakukan transformasi tiga macam plasmid yaitu pcDNA3.1(+), pcDNA3.1HA dan pcDNA3.1HA-MPER2. Sel bakteri hasil transformasi selanjutnya disebar media LB agar dengan Ampisilin. Plasmid vektor, pcDNA3.1, merupakan plasmid yang mengandung gen resisten Ampisilin, sehingga bakteri yang mengandung plasmid ini dapat mewarisi sifat resisten Ampisilin dan dapat tumbuh dalam medium selektif yang mengandung Ampisilin.



Keterangan : Hasil transformasi plasmid ke dalam *E. coli* TOP 10 dalam media LB agar dengan Ampisilin: 1. Transformasi pcDNA3.1 (*wildtype*) menunjukkan adanya pertumbuhan; 2. Transformasi pcDNA3.1HA menunjukkan adanya pertumbuhan; 3. Transformasi pcDNA3.1HA-MPER2 menunjukkan adanya pertumbuhan; 4. Hasil penyebaran sel *E. coli* TOP 10 tanpa transformasi (kontrol negatif) tidak menunjukkan adanya pertumbuhan

Gambar 4. 1 Hasil transformasi plasmid rekombinan ke dalam *E. coli* TOP10

Pada Gambar 4.1, dapat dilihat hasil transformasi ketiga plasmid dalam sel bakteri *E. coli* TOP 10 yang disebar pada media LB agar-Ampisilin setelah diinkubasi dalam suhu 37⁰C selama 16 jam. Adanya pertumbuhan pada cawan petri 1, 2 dan 3 menunjukkan keberhasilan transformasi plasmid dalam sel bakteri, karena hanya koloni bakteri yang mengandung gen resisten Ampisilin yang dapat

tumbuh dalam media tersebut. Sedangkan hasil sebar sel bakteri pada kontrol negatif (perlakuan no. 4) menunjukkan tidak adanya pertumbuhan bakteri. Hal tersebut dapat mengindikasikan dalam berlangsungnya tahap kompetensi sel hingga transformasi tidak terjadi kontaminasi. Bakteri *E. coli* TOP 10 tanpa perlakuan transformasi plasmid merupakan bakteri yang sensitif terhadap Ampisilin, sehingga bakteri tidak dapat tumbuh saat disebar pada media yang mengandung Ampisilin.

Pada tiap cawan petri (no. 1, 2 dan 3) yang ditumbuhi bakteri hasil transformasi kemudian dipilih masing-masing lima koloni bakteri untuk dibuat replika dan dikultur masing-masing dalam media LB broth yang mengandung Ampisilin. Kultur semalam dalam media LB broth dibuat untuk selanjutnya dapat dilakukan isolasi skala kecil. Tabung yang berisi kultur kemudian diinkubasi dalam inkubator goyang bersuhu 37⁰C, dengan kecepatan 200 rpm selama 16 jam (*overnight*). Sedangkan replika kultur dibuat pada media LB agar dengan Ampisilin dan diinkubasi dalam inkubator 37⁰C selama 16 jam. Adanya pertumbuhan pada hasil replika maupun kultur semalam dapat dilihat keesokan harinya.

Pengkulturan sel bakteri pada suhu 37⁰C dilakukan karena suhu optimum *E. coli* untuk dapat tumbuh dengan baik dan melakukan aktivitas metabolismenya pada suhu tersebut (Holt, Krieg, Sneath, Stanley, & Williams, 1994). Sedangkan inkubasi kultur semalam yang dilakukan dalam inkubator goyang sebelum dilakukan kompetensi sel bakteri dimaksudkan agar terjadi kontak dengan frekuensi tinggi antara medium dengan sel bakteri. Adanya kontak yang sering dapat membuat bakteri tumbuh secara optimal (Cappucino & Sherman, 2002). Bakteri *E. coli* TOP 10 banyak digunakan untuk proses pengklonaan dan memperbanyak plasmid karena tingkat efisiensi transformasinya yang tinggi., pengkulturan *E. coli* yang relatif mudah dilakukan dan dapat memperbanyak diri dalam waktu singkat.

4.2 Isolasi Plasmid Skala Kecil

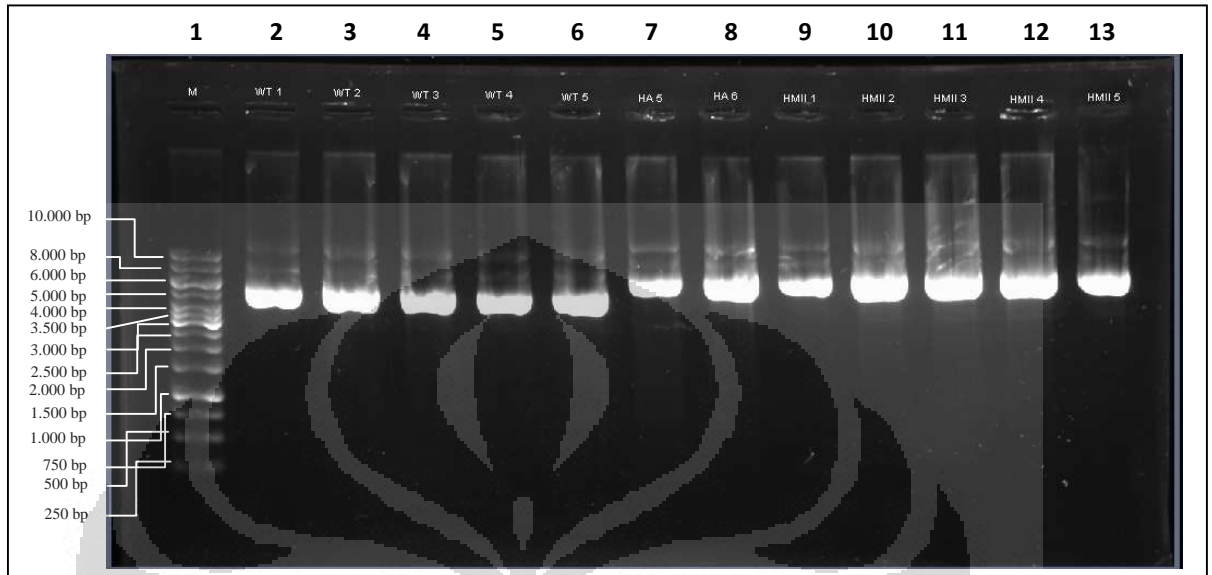
Pada hasil transformasi, masing-masing perlakuan dipilih 5 koloni bakteri yang tumbuh untuk dilakukan tahap isolasi. Preparasi sebelum tahap ini dilakukan

adalah dengan membuat kultur semalam dari tiap koloni pada masing-masing kelompok yang akan diisolasi plasmidnya. Metode isolasi dilakukan berdasarkan protokol dalam Qiaspin Miniprep kit yang telah dimodifikasi sesuai ketentuan laboratorium IHVCB. Isolasi dengan skala kecil pada tahap awal dimaksudkan untuk melakukan verifikasi apakah plasmid yang nantinya akan menjadi komponen vaksin DNA uji telah sesuai dengan yang diinginkan.

Metode isolasi plasmid yang digunakan adalah *alkaline lysis* atau pelisisan bakteri dibawah kondisi alkali. Sebagai tahap awal isolasi, pelisisan sel bakteri yang tidak sempurna dapat menyebabkan berkurangnya jumlah DNA plasmid yang dapat diperoleh. Situasi yang ideal terjadi apabila setiap sel itu terpecah (lisis) secukupnya sehingga memungkinkan DNA plasmid terlepas tanpa terlalu banyak mengkontaminasi DNA kromosom (Old & Primrose, 1985).

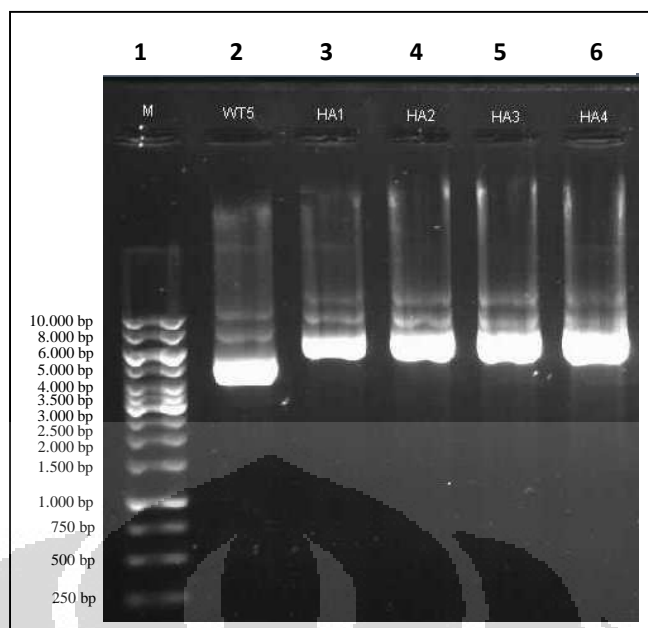
Penggunaan SDS (dalam larutan P2 yang berisi NaOH-SDS) dalam tahap ini ditujukan untuk melarutkan fosfolipid dan protein dari membran sel, sehingga terjadi pengeluaran isi sel. Sementara itu Natrium hidroksida, yang digunakan untuk membuat kondisi alkali, membuat kromosom dan DNA plasmid terdenaturasi. Namun pelisisan dengan pemaparan larutan alkali tidak boleh dilakukan terlalu lama karena dapat membuat plasmid terdenaturasi secara irreversibel. Selanjutnya penambahan N3 yang mengandung Guanidin hidroklorida dan Asam asetat bertujuan untuk menetralkan hasil lisis sebelumnya. Pada tahap ini tampak pada lisat adanya gumpalan yang merupakan protein terdenaturasi, DNA kromosom, debris seluler dan SDS yang telah terpresipitasi. Sementara itu, DNA plasmid mengalami renaturasi dan tetap berada dalam larutan yang jernih (supernatan). Selama penambahan larutan P2 dan N3 tidak dilakukan pengocokan yang kuat dalam menghomogenkan campuran larutan P2 dengan suspensi bakteri. Pengocokan kuat dapat menyebabkan kontaminasi DNA kromosom pada DNA plasmid. Untuk mempermudah pemisahan antara supernatan dan gumpalan yang terbentuk, dilakukan sentrifugasi agar gumpalan mengendap. Penambahan etanol pada tahapan selanjutnya untuk menjenuhkan plasmid hasil isolasi. Sebagai tahap akhir, dilakukan elusi DNA hasil isolasi dari spin kolom [Qiagen]. Elusi merupakan proses terlepasnya ikatan DNA dengan kolom dengan penambahan larutan EB yang mengandung imidazol.

Hasil isolasi plasmid dari tiap-tiap koloni kemudian dilakukan elektroforesis menggunakan gel agarosa 0,8%. Hasil *running* dapat dilihat pada gambar 4.1 dan 4.2.



Keterangan: Lajur 1, marka *gene ruler* 1 kb; Lajur 2-6, berturut-turut hasil isolasi pcDNA3.1(+) *wildtype* koloni 1-5; Lajur 4 7-8, berturut turut hasil isolasi pcDNA3.1HA koloni 5 dan 6; Lajur 9-13. Berturut-turut hasil isolasi pcDNA3.1HA-MPER2. Elektroforesis gel agarosa 0,8% *buffer* TAE 0,5x.

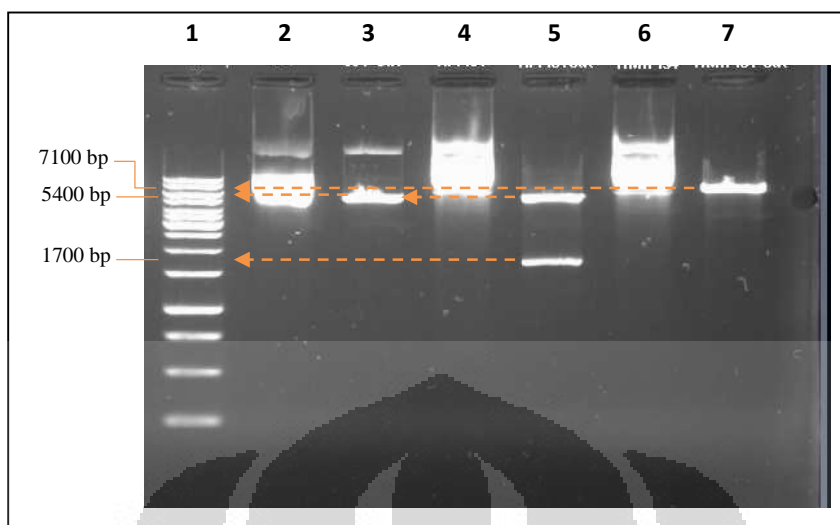
Gambar 4.2 Hasil isolasi plasmid pcDNA3.1(+), pcDNA3.1HA dan pcDNA3.1HA-MPER2



Keterangan: Lajur 1, marka *gene ruler* 1 kb; Lajur 2, hasil isolasi pcDNA3.1(+) *wildtype* koloni 5; Lajur 3-6, berturut turut hasil isolasi pcDNA3.1HA koloni 1-4. Elektroforesis gel agarosa 0,8% *buffer* TAE 0,5x.

Gambar 4.3 Hasil isolasi plasmid pcDNA3.1(+) dan pcDNA3.1HA

Pada gambar 4.1 dan 4.2 ditunjukkan hasil elektroforesis gel agarosa 0,8% tiga macam plasmid, yaitu plasmid pcDNA3.1(+) *wildtype* (wt), pcDNA3.1HA yang mengandung gen hemagglutinin H5N1 dan pcDNA3.1HA-MPER2 yang mengandung gen HA diinsersi MPER pada situs B. Keberadaan plasmid hasil isolasi terlihat dari adanya pita yang terbentuk pada gel agarosa. Plasmid yang belum mengalami restriksi masih berada dalam bentuk sirkular, sehingga pada saat dijalankan pada gel agarosa tampak adanya tiga pita yang terbentuk dalam satu lajur. Pita yang terbentuk dari hasil elektroforesis suatu plasmid dapat menunjukkan jenis plasmid yaitu sirkular, *supercoiled* dan linier (Ausubel *dkk*, 1990). Perbandingan antara DNA plasmid *wildtype*, dengan plasmid pcDNA3.1HA dan pcDNA3.1HA-MPER2 pada gambar 4.1 dan 4.2 menunjukkan adanya perbedaan ukuran pita. Pada gambar tersebut tampak pita dari plasmid pcDNA3.1HA dan pcDNA3.1HA-MPER2 lebih tinggi dibandingkan dengan plasmid *wildtype*, sehingga mengindikasikan dalam plasmid tersebut mengandung suatu gen sisipan. Adanya gen sisipan tersebut selanjutnya diverifikasi dengan melakukan restriksi plasmid menggunakan enzim restriksi dan melakukan sekuensing hasil isolasi.



Keterangan: Lajur 1, marka *gene ruler* 1 kb; Lajur 2, pcDNA3.1(+) koloni 1 sebelum restriksi; Lajur 3, pcDNA3.1(+) koloni 1 setelah restriksi; Lajur 4, pcDNA3.1HA koloni 3 sebelum restriksi; Lajur 4, pcDNA3.1HA koloni 3 setelah restriksi; Lajur 5, pcDNA3.1HA-MPER2 koloni 5 sebelum restriksi; Lajur 6, pcDNA3.1HA-MPER2 koloni 5 setelah restriksi. Elektroforesis gel agarosa 0,8% *buffer* TAE 0,5x.

Gambar 4.4 Hasil restriksi plasmid pcDNA3.1(+), pcDNA3.1HA dan pcDNA3.1HA-MPER2 dengan enzim *BamHI*

Untuk analisis ukuran plasmid dengan restriksi oleh enzim restriksi, dipilih koloni no.1 untuk plasmid pcDNA3.1(+), koloni no.3 untuk plasmid pcDNA3.1HA dan koloni 5 untuk plasmid pcDNA3.1HA-MPER2. Restriksi plasmid dilakukan dengan menggunakan enzim restriksi *BamHI*. Gen penyandi hemaglutinin H5N1 dalam vektor pcDNA3.1(+) diapit oleh situs restriksi *BamHI* yang menjadi situs kloning gen tersebut. Sehingga saat *BamHI* digunakan sebagai enzim restriksi, selain dapat menghasilkan plasmid yang linier juga dapat menyebabkan gen HA dalam pcDNA3.1(+) dapat terlepas. Pita yang muncul pada hasil elektroforesis restriksi plasmid pcDNA3.1HA (gambar 4.3) menunjukkan ukuran gen HA yang terlepas dari vektornya yaitu 1700 bp. Sedangkan pada plasmid pcDNA3.1HA-MPER2 yang dipotong dengan enzim *BamHI* menghasilkan plasmid linier tanpa adanya pelepasan gen sisipan, sehingga dapat dilihat jarak migrasi pita DNA yang berada dibawah garis pita marka 8000 bp dan diatas garis pita marka 6000 bp. Dengan keberadaan pita tersebut disimpulkan ukuran plasmid DNA linier dari pcDNA3.1HA-MPER2 berkisar 7100 bp. Untuk

ukuran plasmid pcDNA3.1(+) ditunjukkan dengan keberadaan pita diatas marka 5000 bp, yakni berkisar 5400 bp. Dengan demikian, hasil analisis ukuran plasmid uji telah sesuai dengan literatur dan penelitian sebelumnya (Life Technologies Corporation, 2001; Bela, 2011; Agustian, 2012, *unpublish*). Tebalnya pita yang ditunjukkan pada lajur 2, 4 dan 6 pada gambar 4.3 dapat menunjukkan besarnya konsentrasi plasmid hasil isolasi.

Kemudian verifikasi dilanjutkan dengan dilakukannya sekuensing plasmid hasil isolasi yang sebelumnya telah dianalisis ukurannya.

4.3 Sekuensing DNA plasmid pcDNA3.1HA dan pcDNA3.1HA-MPER2

Tahap ini dilakukan untuk melakukan verifikasi kebenaran urutan basa nukleotida gen HA yang telah dimutasi (dilakukan insersi pada situs antigenik B dengan MPER). Sekuensing dilakukan hanya untuk melihat urutan basa nukleotida pada bagian yang disisipi MPER-2. Sedangkan untuk sekuensing DNA gen HA-MPER2 digunakan dua primer yaitu H688R dan H327F. Hasil sekuensing DNA gen HA-MPER2 menunjukkan urutan basa nukleotida yang benar sesuai dengan yang diharapkan. Analisis urutan basa nukleotida dilakukan dengan menggunakan piranti lunak Bioedit.

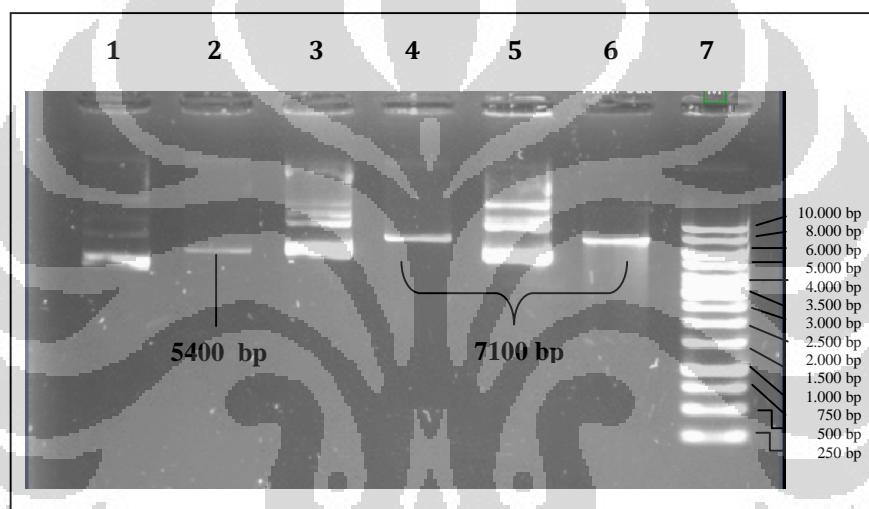
4.4 Isolasi Skala Besar

Setelah melewati analisis sekuensing dan didapatkan urutan basa nukleotida yang sesuai, koloni bakteri terpilih yang mengandung plasmid uji (baik *wildtype*, pcDNA3.1HA dan pcDNA3.1HA-MPER2) selanjutnya dibiakkan dalam LB cair (+Ampisilin) dalam jumlah yang besar. Hal tersebut dilakukan dengan tujuan untuk mendapatkan konsentrasi tiap-tiap plasmid dalam jumlah yang cukup sebagai komponen vaksin DNA. Volume media yang digunakan untuk membiakkan bakteri berkisar 500-1000 ml LB cair. Metode yang digunakan untuk isolasi skala besar sama dengan prinsip isolasi skala kecil, yakni lisis sel bakteri dibawah kondisi alkali.

Plasmid hasil isolasi yang telah dipresipitasi selanjutnya dilarutkan dalam PBS 1x. Pengukuran konsentrasi plasmid hasil isolasi penting dilakukan untuk mengetahui kecukupan jumlah plasmid yang akan digunakan untu imunisasi.

Analisis nanodrop dilakukan untuk mengukur konsentrasi plasmid. Pada isolasi plasmid pcDNA3.1(+) didapatkan konsentrasi 3251,2 ng/μl, pcDNA3.1HA sebesar 8480 ng/μl dan pcDNA3.1HA-MPER2 sebesar 2862,5 ng/μl. Kemurnian dari ketiga jenis plasmid tersebut berada dalam kisaran 1,7-2, yang menunjukkan bahwa plasmid hasil isolasi dalam keadaan cukup murni.

Setelah analisis nanodrop, dilakukan elektroforesis gel agarosa dengan terlebih dahulu mendilusi plasmid hasil isolasi dengan PBS 1x hingga didapatkan konsentrasi 20 ng/μl. Hal tersebut dimaksudkan agar pita yang terbentuk tidak terlalu tebal. Pada gambar 4.4 dapat dilihat hasil isolasi masing-masing plasmid dalam skala besar yang dijalankan pada gel agarose 0,8%.



Keterangan : Lajur 7, marka *gene ruler* 1 kb; Lajur 1, pcDNA3.1(+) sebelum restriksi; Lajur 2, pcDNA3.1(+) setelah restriksi; Lajur 3, pcDNA3.1HA sebelum restriksi; Lajur 4, pcDNA3.1HA setelah restriksi; Lajur 5, pcDNA3.1HA-MPER2 sebelum restriksi; Lajur 6, pcDNA3.1HA-MPER2 setelah restriksi. Elektroforesis gel agarosa 0,8% *buffer* TAE 0,5x.

Gambar 4.5 Hasil restriksi plasmid pcDNA3.1(+), pcDNA3.1HA dan pcDNA3.1HA-MPER2 dengan enzim *HindIII*

Restriksi plasmid untuk melakukan verifikasi ukuran plasmid pada hasil isolasi skala besar dilakukan dengan menggunakan enzim *HindIII*. Berbeda dengan *BamHI* pada restriksi sebelumnya, pemotongan plasmid yang membawa gen HA dengan enzim *HindIII* tidak menyebabkan terlepasnya gen sisipan HA dari vektor pcDNA3.1(+). Oleh karena itu, pada hasil elektroforesis hanya muncul masing-masing satu pita pada hasil restriksinya. Dari ukuran yang ditunjukkan

oleh keberadaan pita, didapatkan ukuran pcDNA3.1(+), pcDNA3.1HA dan pcDNA3.1HA-MPER2 berturut-turut 5400 bp dan 7100 bp.

4.5 Preparasi Vaksin dan Imunisasi

Hewan uji yang digunakan dalam penelitian ini adalah mencit galur BALB/c betina yang berumur 6 minggu.

Pada preparasi vaksin DNA diawali dengan melarutkan DNA hasil isolasi dalam PBS. Setelah mendapatkan konsentrasi yang diinginkan yakni 50 μ g, DNA yang telah larut kemudian ditambahkan DMRIE-c dengan perbandingan molar 1:2 (DNA:DMRIE-c). Kemudian campuran ditambahkan PBS 1x hingga volumenya 50 μ l untuk vaksinasi satu ekor mencit. Sehingga komposisi vaksin DNA pada setiap satu kali imunisasi adalah 50 μ g/50 μ l. Penentuan dosis 50 μ g/50 μ l didasarkan pada penelitian sebelumnya yang telah dilakukan di Laboratorium IHVCB-UI (Bela, 2011).

Penggunaan DMRIE-c sebagai kation lipid berfungsi untuk melindungi DNA selama terdistribusi di dalam tubuh sebelum sampai ke sel target. Selain itu, kationik lipid telah diketahui dapat berfungsi sebagai adjuvan vaksin. Oleh karena itu, dengan penambahan kation lipid ke dalam formulasi diharapkan dapat meningkatkan respon imun terhadap plasmid pengkode antigen yang diinjeksikan melalui intramuskular (Vical Inc., 2012).

Pengambilan darah pertama yang akan digunakan sebagai *baseline* pada uji serologis dilakukan satu minggu sebelum imunisasi pertama dilakukan. Selanjutnya pengambilan darah dilakukan setiap dua minggu setelah imunisasi, baik *prime* maupun *booster* I dan *booster* II. Pengambilan darah yang dilakukan dua minggu setelah imunisasi didasarkan atas timbulnya IgG pada serum mulai dapat dideteksi pada 7 hari setelah pemaparan antigen dan mencapai kadar puncak pada 10-14 hari setelah pemaparan antigen (Kresno, 2010).

Pengambilan darah pada mencit dilakukan pada *facial vein* sebanyak 150 μ l. Pemisahan serum dilakukan dengan cara sentrifugasi pada kecepatan 5000 rpm selama 15 menit. Analisis antibodi dengan metode ELISA kemudian dilakukan pada serum yang telah dipisahkan dari sel darah merah hewan uji. Jika belum

akan digunakan untuk uji, serum disimpan pada -20°C atau ditambahkan gliserol 70% (1:1) dan disimpan pada -80°C .

4.6 Uji Serologis

4.6.1 Optimasi ELISA dengan antigen peptida ELDKWAS

ELISA dapat digunakan untuk mendeteksi antibodi spesifik dalam suatu sampel. Dalam penelitian ini metode ELISA yang digunakan adalah ELISA nonkompetitif tidak langsung, dimana peptida ELDKWAS sintetik digunakan sebagai antigen yang dilapiskan ke dasar pelat ELISA. Penambahan IgG antimouse berlabel biotin (antibodi kedua) berfungsi sebagai antibodi pendeteksi adanya ikatan antigen-antibodi. Jika dalam serum terdapat antibodi yang dapat berikatan dengan antigen (peptida ELDKWAS) pada dasar pelat, maka antibodi kedua akan mendeteksi adanya ikatan tersebut dan ikut berikatan dengan kompleks antigen-antibodi pada serum. Dalam pengujian ELISA digunakan enzim HRP dan substrat OPD (*o-phenylenediamine*). Hidrolisis substrat oleh enzimnya dapat menghasilkan warna dengan intensitas tertentu, tergantung dari banyaknya kompleks antigen-antibodi yang terbentuk. Penghentian reaksi hidrolisis dilakukan dengan menambahkan asam sulfat 2,5M (Kresno, 2010).

Inkubasi setelah pemberian peptida ELDKWAS dalam *coating buffer* pada penelitian ini dilakukan selama semalam dalam suhu 4°C . Jika inkubasi dilakukan selama semalam, pemilihan suhu 4°C sebagai tempat inkubasi dimaksudkan agar pelat tidak menjadi tempat pertumbuhan bakteri atau terkontaminasi bakteri. Sebab adanya kontaminasi dapat membuat data hasil ELISA menunjukkan positif palsu. Hal tersebut dikarenakan, antibodi yang akan diujikan merupakan antibodi poliklonal mencit, dimana besar kemungkinan terdapat pula antibodi terhadap bakteri floranormal yang memang ada dalam tubuh mencit (misal, *E. coli* dalam usus).

Pengujian ELISA dilakukan peneliti tidak hanya terhadap serum kelompok perlakuan divaksinasi pcDNA3.1(+), pcDNA3.1HA dan pcDNA3.1HA-MPER2, tapi juga dibandingkan dengan pcDNA3.1HA-MPER1. Namun, untuk optimasi konsentrasi serum dan peptida hanya dilakukan terhadap serum kelompok uji

(divaksinasi HA-MPER2). Sedangkan konsentrasi serum kelompok lain nantinya mengikuti hasil optimasi serum kelompok uji.

Optimasi uji serologis ELISA dilakukan bukan hanya terhadap peptida ELDKWAS sebagai antigen yang di-*coating* pada sumuran tapi juga dilakukan optimasi terhadap serum antibodi. Tujuan dilakukan optimasi yakni mendapatkan konsentrasi peptida maupun antibodi yang paling optimum namun juga dapat menghemat serum. Pada optimasi peptida ELDKWAS sebagai antigen dibuat 4 seri konsentrasi yaitu 7,5 µg/ml, 10 µg/ml, 12,5 µg/ml dan 15 µg/ml. Sedangkan pada serum mencit dilakukan pengenceran berseri dari konsentrasi 1/12,5; 1/125; 1/50; hingga 1/100. Rancangan peta optimasi dapat dilihat pada lampiran 1. Serum yang digunakan untuk optimasi adalah gabungan serum I kelompok perlakuan yang diimunisasi vaksin DNA HA-MPER2 sebagai baseline dan serum IV pada kelompok yang sama. Penggunaan serum mencit divaksinasi plasmid rekombinan dalam optimasi uji ELISA karena belum diketahui kemampuan vaksin DNA HA-MPER2 dapat menginduksi respon antibodi spesifik terhadap peptida ELDKWAS. Uji dilakukan secara duplo untuk didapatkan hasil reratanya. Pemetaan uji optimasi peptida konsentrasi ELDKWAS dan serum untuk ELISA dan pembacaan ELISA *reader* terhadap hasil optimasi tersebut pada panjang gelombang 490 nm dapat dilihat pada lampiran 1 dan 2.

Pada grafik hasil ELISA optimasi peptida ELDKWAS (lampiran 1) didapatkan konsentrasi yang optimum sebesar 12,5 µg/ml. Pemilihan konsentrasi tersebut didasarkan adanya perbedaan reaktivitas serum yang terlihat jelas antara serum 1 (baseline) dengan serum 4 yang dapat dilihat pada tiap pengenceran serum (gambar 4.8). Pada grafik (Gambar 4.8) tampak ada respon antibodi spesifik ELDKWAS pada serum 4 lebih tinggi dibandingkan dengan serum 1 (baseline) pada setiap pengenceran. Sebenarnya pada data reaktivitas serum yang dihasilkan saat penggunaan konsentrasi peptida 15 µg/ml dan 10 µg/ml juga terlihat adanya perbedaan antara serum 1 dan serum 4. Namun kembali lagi pada tujuan optimasi adalah didapatkannya konsentrasi peptida dalam jumlah sedikit, namun telah dapat menunjukkan reaktivitas yang baik dengan serum uji. Tidak dipilihnya konsentrasi peptida 10 µg/ml karena perbedaan reaktivitas antar serum 1 dan serum 4 sempit (Gambar 4.9), Oleh karena itu, dipilih konsentrasi peptida

12,5 µg/ml yang diharapkan dapat menghasilkan reaktivitas yang efektif tetapi tetap efisien. Pada semua grafik hasil optimasi peptida dengan konsentrasi masing-masing 15 µg/ml, 12,5 µg/ml, 10 µg/ml dan 7,5 µg/ml terlihat adanya data yang tidak konsisten (grafik meningkat) di setiap pengenceran serum yang semakin besar (1/100). Hal tersebut mungkin saja terjadi akibat meningkatnya reaksi nonspesifik saat pengenceran serum semakin besar.

Selanjutnya untuk hasil optimasi pengenceran serum (lampiran 2) pada tiga kelompok berbeda menunjukkan bahwa respon antibodi spesifik MPER gp41 (peptida ELDKWAS dengan konsentrasi 12,5 µg/ml) dapat memperlihatkan hasil yang baik bila digunakan pengenceran serum 1/25 pada masing-masing kelompok. Saat melakukan optimasi, juga dilakukan pengujian ELISA terhadap beberapa kontrol negatif dengan beberapa perlakuan (lampiran 3). Kontrol negatif ini diperlukan untuk menghindari terjadinya hasil positif palsu pada hasil pengujian. Hasil uji kontrol negatif dapat dilihat pada lampiran 4. Pada grafik terlihat pada kondisi b dan c tanpa adanya peptida ELDKWAS, reaktivitas serum yang ditunjukkan dengan tingginya serapan (nilai OD) tidak jauh berbeda dengan kondisi e dan f dengan adanya peptida ELDKWAS. Berdasarkan hasil tersebut, dapat dicurigai adanya reaksi non spesifik yang mengganggu hasil pengukuran sebenarnya. Peptida ELDKWAS yang memiliki ukuran lebih kecil dibandingkan gelatin (sebagai larutan pengeblok) dapat menjadi penyebab peptida (sebagai antigen) tidak terekspos dengan baik. Dengan demikian, terjadinya reaksi antigen-antibodi yang spesifik mengalami hambatan.

Berdasarkan hasil uji ELISA pada kontrol negatif yang menghasilkan kesimpulan adanya interaksi nonspesifik, maka dilakukan optimasi larutan *blocking* dan larutan pengencer (yang juga mengandung gelatin) untuk meminimalisir hasil yang bias akibat pengaruh reaksi nonspesifik tersebut. Hasil optimasi didapatkan konsentrasi larutan *blocking* yang akan digunakan yaitu 1% gelatin dalam PBS, dan larutan pengencer serum yaitu 1,5% gelatin dalam PBS. Grafik hasil optimasi dapat dilihat pada lampiran 4.

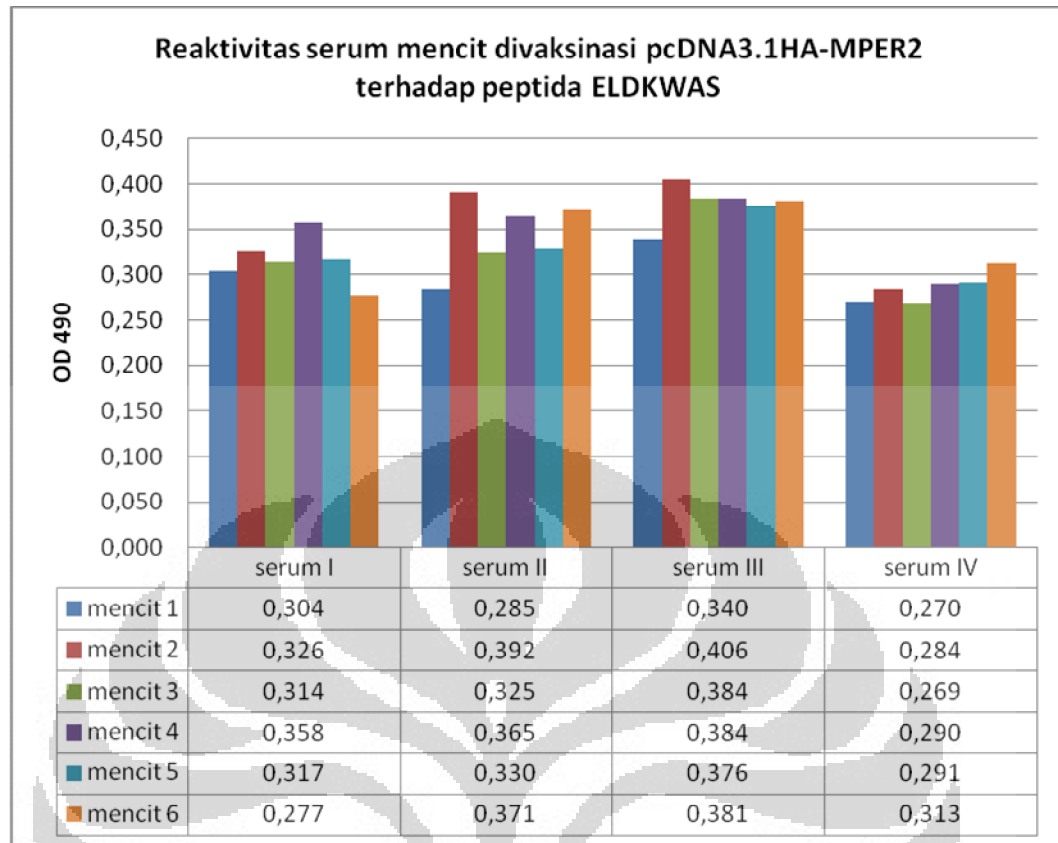
Dengan demikian, berdasarkan hasil seluruh optimasi untuk uji ELISA digunakan pengenceran serum darah menjadi 1/50 dan peptida ELDKWAS 12,5 µg/ml. Pertimbangan menggunakan serum dengan pengenceran yang lebih besar

diharapkan dapat meminimalisir reaksi nonspesifik yang mungkin terjadi. Pada pengujian ELISA selanjutnya, akan digunakan juga pembanding serum kelompok divaksinasi DNA HA-MPER1. Dalam preparasi hingga penyuntikan vaksin DNA HA-MPER1 terhadap hewan coba dilakukan oleh peneliti lain.

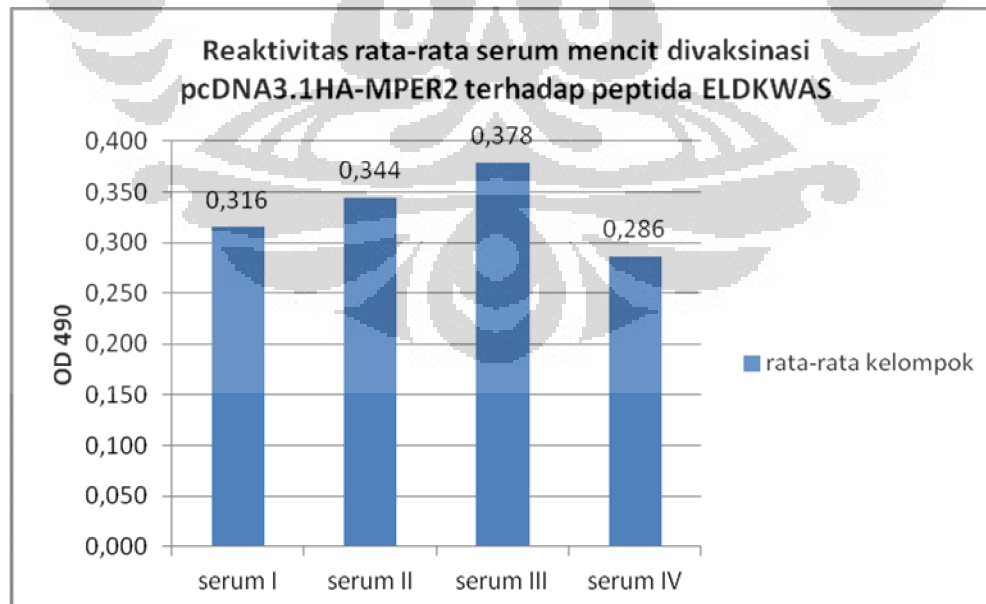
4.6.2 Respon antibodi mencit BALB/c terhadap peptida ELDKWAS

4.6.2.1 Reaktivitas serum mencit divaksinasi vaksin DNA pcDNA3.1HA-MPER2

Analisis reaktivitas masing-masing serum mencit perlakuan divaksinasi pcDNA3.1HA-MPER2 terhadap antigen peptida ELDKWAS secara umum memperlihatkan adanya kecenderungan peningkatan pada serum II dan III dengan kisaran OD dalam kelompok pada serum II adalah 0,285 hingga 0,392 dan pada serum III adalah 0,340 hingga 0,406. Waktu pengambilan serum masing-masing berjarak 2 minggu dari waktu imunisasi, kecuali serum I yang diambil sebelum dilakukan imunisasi. Dilihat dari waktunya, serum II diambil 2 minggu setelah imunisasi *prime* dan serum III diambil setelah 2 minggu dilakukan imunisasi *booster* 1. Sedangkan pada serum IV tampak adanya penurunan reaktivitas antibodi dengan kisaran OD 0,270 hingga 0,313. Jika dilihat pada grafik rata-rata kelompok terhadap waktu pengambilan serum yang ditunjukkan pada Gambar 4.16 terlihat pada serum I hingga serum III cenderung mengalami peningkatan reaktivitas serum terhadap peptida ELDKWAS. Namun fenomena yang menarik dapat dilihat pada serum IV, yaitu serum yang diambil 2 minggu setelah pemberian *booster* 2, terjadi penurunan yang cukup jelas terlihat (Lampiran 5).



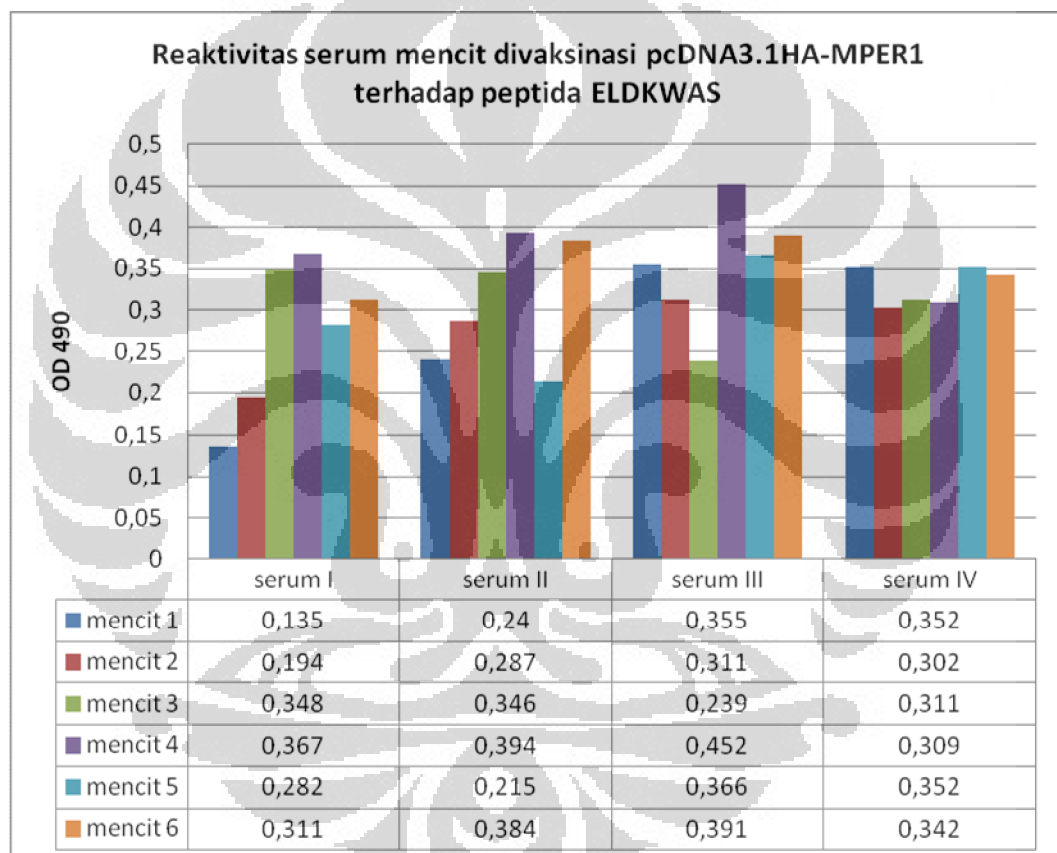
Gambar 4.15 Reaktivitas serum mencit divaksinasi vaksin DNA HA-MPER2 terhadap antigen peptida ELDKWAS



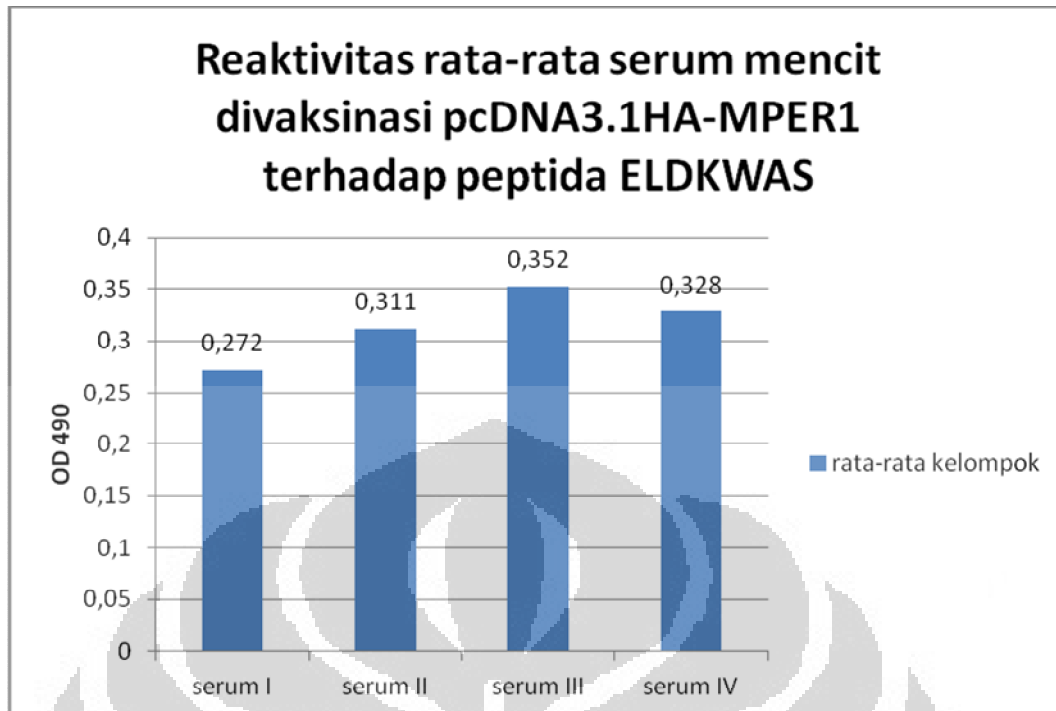
Gambar 4.16 Reaktivitas rata-rata serum mencit divaksinasi vaksin DNA HA-MPER2 terhadap antigen peptida ELDKWAS

4.6.2.2 Reaktivitas serum mencit divaksinasi vaksin DNA pcDNA3.1HA-MPER1

Reaktivitas serum mencit perlakuan divaksinasi pcDNA3.1HA-MPER1 terhadap peptida ELDKWA memperlihatkan nilai OD serum I, II, III dan IV secara berurutan berkisar antara 0,135-0,367; 0,215-0,394; 0,239-0,452 dan 0,302-0,352. Data tersebut menunjukkan adanya kecenderungan peningkatan hanya pada serum I hingga III, kemudian pada serum IV mengalami penurunan. Sedangkan pada nilai OD rata-rata mencit dalam satu kelompok dapat dilihat terjadinya peningkatan pada serum I hingga serum III, kemudian mengalami penurunan dengan kisaran yang dekat (lampiran 6).



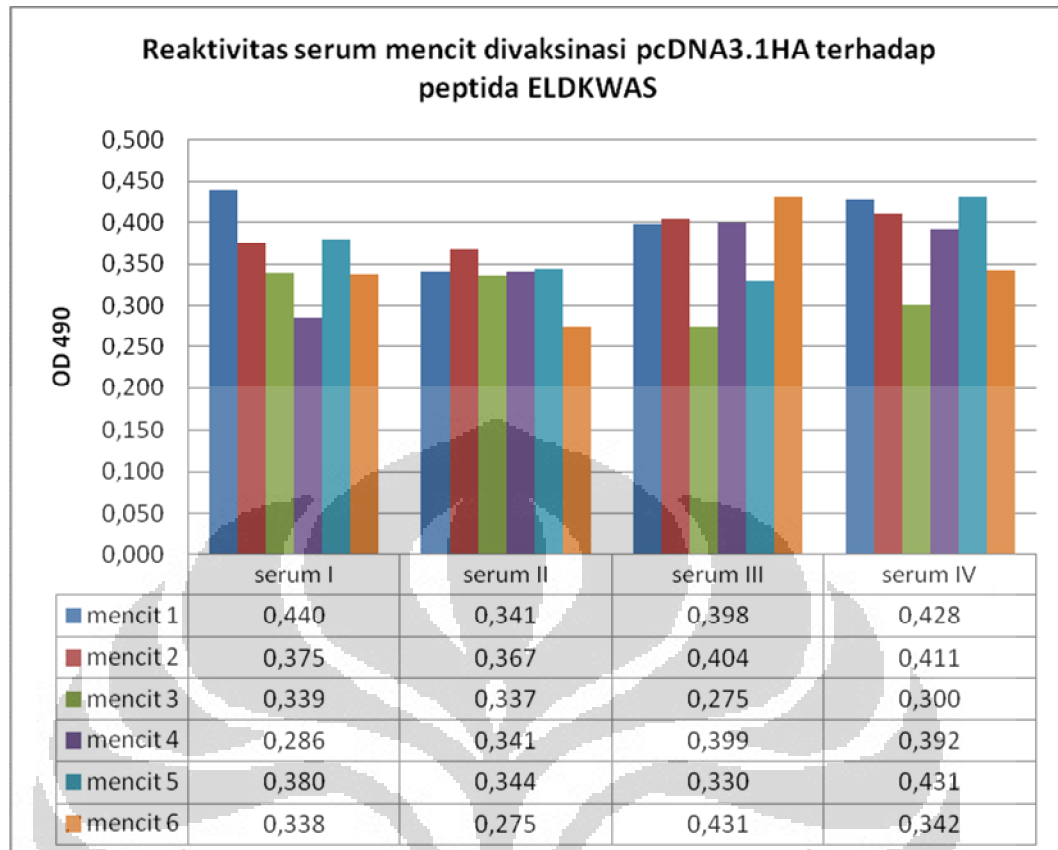
4.17 Reaktivitas serum mencit divaksinasi vaksin DNA HA-MPER1 terhadap antigen peptida ELDKWAS



Gambar 4.18 Reaktivitas rata-rata serum mencit divaksinasi vaksin DNA HA-MPER1 terhadap antigen peptida ELDKWAS

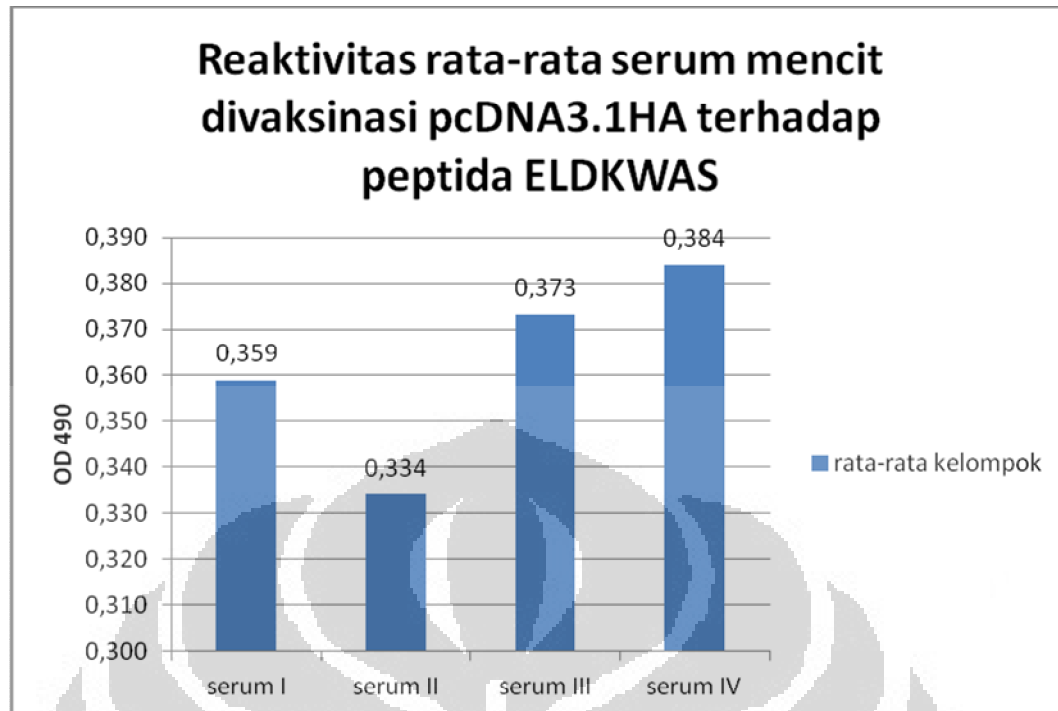
4.6.2.3 Reaktivitas serum mencit divaksinasi vaksin DNA pcDNA3.1HA

Reaktivitas serum mencit perlakuan divaksinasi pcDNA3.1HA pada pengujian ELISA memperlihatkan nilai OD serum I berkisar antara 0,286-0,440. Sedangkan pada serum II, reaktivitas terhadap peptida menunjukkan nilai OD antara 0,275-0,367. Pada serum III tampak terjadinya peningkatan reaktivitas dengan ditunjukkan oleh nilai OD antara 0,275-0,431 dan cenderung meningkat lagi reaktivitasnya pada serum IV dengan nilai OD berkisar 0,300-0,431.



Gambar 4.19 Reaktivitas serum mencit divaksinasi vaksin DNA HA terhadap antigen peptida ELDKWAS

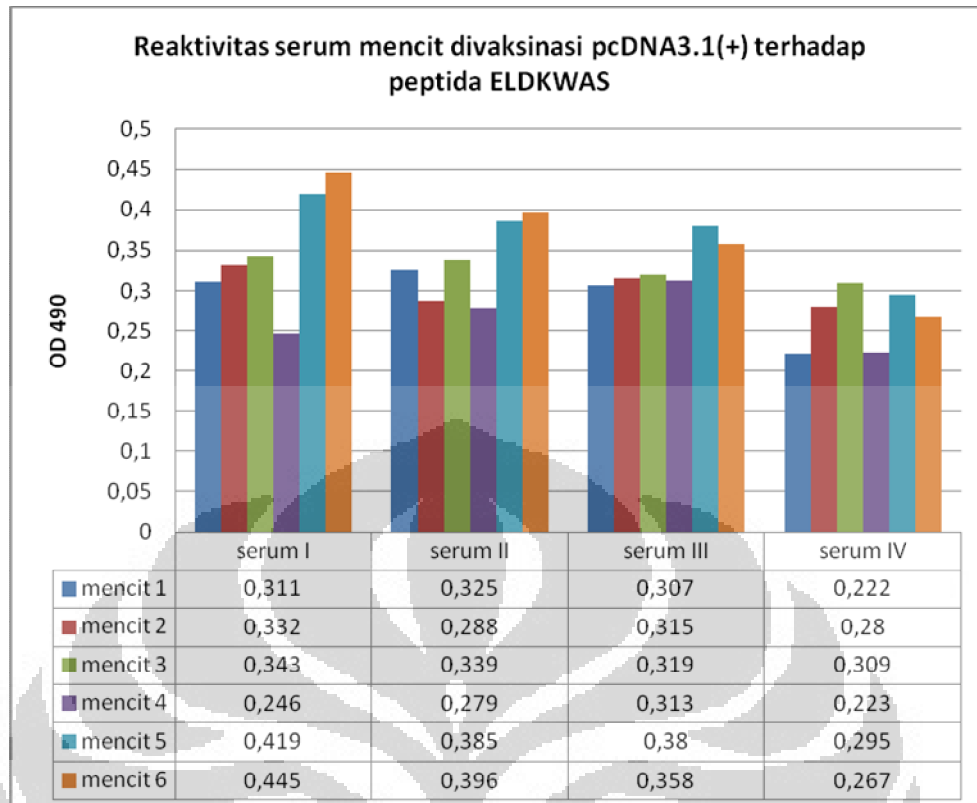
Namun, dilihat dari reaktivitas rata-rata kelompok mencit divaksinasi HA yang terlihat pada Gambar 4.20, menunjukkan adanya peningkatan dari serum II hingga serum IV, namun tampak mengalami penurunan pada serum II (Lampiran 7)



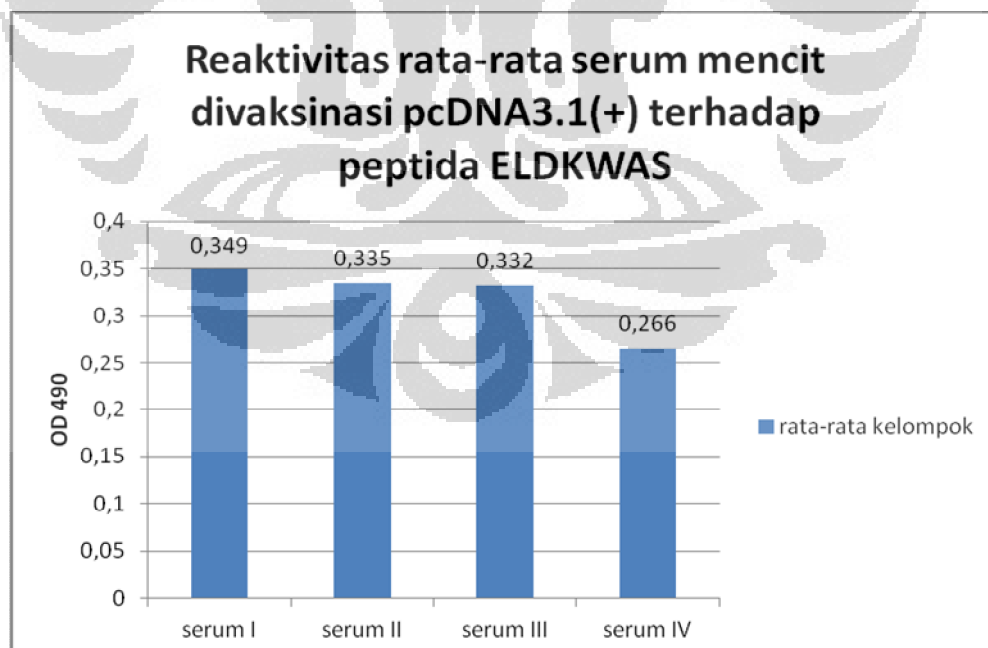
Gambar 4.20 Reaktivitas rata-rata serum mencit divaksinasi vaksin DNA HA terhadap antigen peptida ELDKWAS

4.6.2.4 Reaktivitas serum mencit divaksinasi vaksin DNA pcDNA3.1(+)

Pada kelompok kontrol negatif tampak mengalami penurunan reaktivitas secara berangsur, dapat dilihat pada gambar 4.21 dan 4.22. Kisaran OD pada serum I antara 0,2455-0,445, serum II antara 0,2785-0,3955, OD pada serum III berkisar 0,307-0,3795 dan serum IV memperlihatkan OD yang cenderung turun dari serum sebelumnya yakni berkisar antara 0,222-0,309.



Gambar 4.21 Reaktivitas serum mencit divaksinasi vaksin DNA *wildtype* terhadap antigen peptida ELDKWAS



Gambar 4.22 Reaktivitas rata-rata serum mencit divaksinasi vaksin DNA *wildtype* terhadap antigen peptida ELDKWAS

4.6.3 Hubungan waktu pengambilan serum dengan reaktivitas serum pada semua kelompok uji

Analisis dilakukan dengan membandingkan waktu pengambilan serum pada masing-masing kelompok mencit diimunisasi vaksin DNA. Pada waktu pengambilan serum I, nilai rata-rata OD pada masing-masing kelompok uji memperlihatkan data terdistribusi normal dengan masing-masing kelompok memiliki nilai $p > 0,05$. Kemudian analisis dilanjutkan dengan uji ANOVA untuk melihat perbedaan masing-masing perlakuan terhadap kadar antibodi spesifik antigen peptida ELDKWAS pada serum I. Uji ANOVA memperlihatkan bahwa tidak adanya perbedaan kadar antibodi yang signifikan antar kelompok perlakuan ($p = 0,121$).

Kemudian dianalisis kadar antibodi spesifik pada serum II tiap kelompok perlakuan. Adanya perbedaan diuji dengan uji Kruskal-Wallis karena pada hasil uji normalitas data tidak terdistribusi normal. Hasil uji Kruskal-Wallis menunjukkan tidak adanya perbedaan kadar antibodi pada serum II antar kelompok dengan nilai $p = 0,957$. Begitu pula yang terjadi pada serum III yang dinilai dengan uji ANOVA karena data terdistribusi normal, tidak ada perbedaan kadar antibodi yang bermakna antar kelompok.

Adanya perbedaan bermakna pada kadar antibodi tiap kelompok terjadi pada serum IV, yang diuji dengan uji Kruskal-Wallis (nilai $p = 0,001$). Adanya perbedaan kadar yang bermakna terjadi pada kelompok kontrol (divaksinasi pcDNA3.1) dengan kelompok divaksinasi HA dan antar kelompok kontrol dengan kelompok divaksinasi HA-MPER1.

Hampir semua kelompok mencit perlakuan (kecuali kelompok kontrol *wildtype*) yaitu kelompok divaksinasi HA-MPER2, HA-MPER1 dan HA menunjukkan adanya peningkatan respon antibodi spesifik jika dilihat dari grafik hasil ELISA. Namun, peningkatan reaktivitas tersebut tidak bermakna secara statistik.

Vaksin dengan kandungan plasmid rekombinan penyandi protein HA menimbulkan respon antibodi yang lebih tinggi dibandingkan vaksin dengan komposisi pcDNA3.1HA-MPER1 maupun pcDNA 3.1HA-MPER2. Hal ini bisa disebabkan oleh berbagai hal, diantaranya yaitu kemungkinan terjadinya reaksi

non spesifik yang telah dibuktikan pada pengujian kontrol negatif. Besarnya kemungkinan terjadinya ikatan non spesifik diperkuat dengan kecilnya ukuran peptida ELDKWAS yang digunakan sebagai antigen yang dilapiskan pada pelat ELISA. Sehingga bisa saja peptida tersebut tidak terpapar dengan antibodi spesifiknya, tertutupi oleh gelatin yang berukuran lebih besar sebagai komponen larutan *blocking*. Oleh karena itu, tingginya kadar antibodi pada serum kelompok divaksinasi HA belum tentu mengindikasikan bahwa antibodi yang diinduksi oleh vaksin tersebut merupakan antibodi spesifik MPER gp41 (ELDKWAS). Namun, tidak menutup kemungkinan pada protein HA memang terdapat homologi dengan asam amino ELDKWAS sehingga tingginya kadar antibodi dapat disebabkan adanya reaksi silang. Untuk menjawab hal ini, sangat perlu dilakukan penelitian lebih lanjut baik dengan menggunakan uji homologi ataupun melakukan perbandingan pengukuran titer antibodi dengan metode ELISA menggunakan antigen spesifik HA dan antigen peptida ELDKWAS.

Jika melihat sebaran data dari hasil ELISA pada serum IV kelompok mencit divaksinasi HA-MPER2 dan kelompok mencit divaksinasi HA-MPER1, terjadi penurunan reaktivitas serum. Namun, pada sebaran data di serum II dan III terjadi peningkatan titer antibodi. Hasil tersebut menunjukkan kemungkinan ada faktor luar yang mempengaruhi data sehingga terjadi penyimpangan hasil. Faktor yang mempengaruhi menyimpangnya data bisa saja disebabkan karena melakukan ELISA dengan cara manual. Dikatakan demikian, karena dalam ELISA banyak sekali tahapan kritis yang dapat menentukan kebenaran hasil pembacaan pada tahap akhir. Salah satunya yakni tahap pencucian dengan *buffer* pencuci, dimana perlakuan pencucian terhadap pelat dilakukan hampir di setiap tahapan. Sehingga jika terjadi kesalahan bisa saja mengakibatkan hasil yang fatal.

Pada konstruksi plasmid rekombinan HA dimutasi situs B dengan insersi MPER (epitop ELDKWAS) diharapkan dapat menginduksi antibodi spesifik terhadap MPER gp41 HIV-1 dengan titer tinggi dan memiliki kemampuan netralisasi. Induksi titer antibodi tinggi diharapkan karena HA H5N1 merupakan protein permukaan yang dapat menginduksi pengeluaran sitokin secara berlebih. Namun, dari hasil analisis ini dapat disimpulkan bahwa vaksin DNA HA-MPER2 dapat menginduksi respon antibodi spesifik MPER gp41 HIV-1, namun dengan

kadar yang masih rendah. Hal ini mungkin karena struktur HA MPER2 pada *scaffold* HA kurang dapat menginduksi respon antibodi, selain itu adanya pengaruh reaksi non spesifik yang tinggi bisa saja menutupi respon antibodi spesifik terhadap ELDKWAS. Oleh karena itu, masih perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai komposisi vaksin maupun strategi yang paling efektif untuk dapat meningkatkan induksi antibodi spesifik bahkan netralisasi MPER gp41 HIV-1.



BAB 5

KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

1. Pada hasil analisis diketahui terdapat respon antibodi spesifik terhadap MPER gp41 HIV-1 pada mencit BALB/c yang diimunisasi vaksin DNA HA-MPER2 HIV-1 (plasmid pcDNA3.1 HA-MPER2).
2. Pada preparasi vaksin sebelum imunisasi didapatkan plasmid pcDNA3.1HA-MPER2, plasmid pcDNA3.1HA, dan plasmid pcDNA3.1 (*wildtype*) dengan kemurnian antara 1,7-2 dengan jumlah yang mencukupi untuk imunisasi masing-masing 6 mencit BALB/c.
3. Terdapat perbedaan yang bermakna respon antibodi spesifik MPER gp41 HIV-1 pada serum IV populasi mencit BALB/c yang diimunisasi dengan pcDNA3.1(+) dengan kelompok divaksinasi pcDNA3.1HA-MPER1, pcDNA3.1HA.

5.2 Saran

1. Perlunya dilakukan pengujian lebih lanjut mengenai respon antibodi spesifik MPER gp41 HIV-1 oleh vaksin DNA HA dengan cara membandingkan reaktivitas antibodi yang dihasilkan dengan antigen spesifik HA dan reaktivitas antibodi yang dihasilkan dengan antigen peptida ELDKWAS.
2. Penelitian dan pertimbangan lebih lanjut sangat dibutuhkan dalam menentukan komposisi vaksin DNA HIV-1 sehingga dapat meningkatkan induksi antibodi netralisasi terhadap HIV-1.

DAFTAR ACUAN

- Agustia, R. (2011). *Pengidap HIV/AIDS Indonesia Mencapai 200 Ribu*. Dipetik 24 Januari, 2012, dari Tempo.Co: <http://www.tempo.co/read/news/2011/11/25/173368488/Pengidap-HIVAids-Indonesia-Mencapai-200-Ribu>.
- Agustian, A. (2012, *unpublish*). *Konstruksi Plasmid Pengkode Protein Hemagglutinin H5N1 dengan Sisipan Epitop Netralisasi HIV-1 Daerah MPER gp41 sebagai Kandidat Vaksin DNA HIV-1* [Tesis]. Jakarta: Universitas Indonesia.
- Ausubel, F. M., R. Brent, R.E. Kingston, D.D. Moore, J.G. Seidman, J.A. Smith & K. Struhl. (1990). *Current protocols in molecular biology*. Vol. 1. John Wiley & Sons, Inc., Newyork, 1.0.1 - 9.9.3.
- Avert. (2011). *HIV Types, Subtypes Groups and Strains*. Dipetik 24 Januari, 2012, dari AVERT: <http://www.avert.org/hiv-types.htm>.
- Baratawidjaja, K. G., & Rengganis, I. (2006). *Imunologi Dasar*. Dalam P. D. Indonesia, *Buku Ajar Ilmu Penyakit Dalam Jilid I*. Jakarta: Pusat Penerbitan Departemen Ilmu Penyakit Dalam FK UI, 235-241.
- Belasio, E. F., Raimondo, M., Suligoi, B., & Butto, S. (2010). HIV Virology and Pathogenetic Mechanisms of Infection: a brief overview. *Ann. Ist. Super. Sanita*, 5-14.
- Bennett, N. J. (2011). *HIV Disease*. Dipetik 21 Januari, 2012, dari WebMD LLC: <http://emedicine.medscape.com/article/211316-overview>.
- Bernard, A., & Payton, M. (1995). Selection of *Escherichia coli* Expression System. *Current Protocols in Protein Science*, 5.2.1 - 5.2.18.
- Birnboim, H. (1983). A Rapid Alkaline Extraction Method for The Isolation of Plasmid DNA. *Methods Enzymol.*, 100, 243-255.
- Birnboim, H. C., & Doly, J. (1979). A Rapid Alkaline Lysis Procedure for Screening Recombinant Plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.*, 7, 1513-1522.
- Bela, B. (2011). *Pengembangan vaksin DNA influenza A H5N1: konstruksi plasmid vaksin DNA dan respon antibodi spesifik hemagglutinin mencit BALB/c terhadap vaksin DNA hemagglutinin dengan variasi penambahan DNA pengeksresi neuraminidase dan matriks* [Disertasi]. Jakarta: Universitas Indonesia.

- Cappucino, J., & Sherman, N. (2002). *Microbiology: A Laboratory Manual*, 6th ed. San Fransisco: Benjamin Cummings.
- Cheng, X., Xu, Q., Song, E., Yang, C., Kemble, G., & Jin, H. (2010). The Hemagglutinin Protein of Influenza A/Vietnam/1203/2004 (H5N1) Contributes to Hyperinduction of Proinflammatory Cytokines in Human Epithelial Cells. *J. Virol*, 406, 28-36.
- Dirjen P2PL Kemenkes RI. (2012). *Laporan Kementerian Kesehatan Triwulan Kesatu 2012*. Dipetik 16 Juni, 2012, dari Komisi penanggulangan AIDS: <http://www.aidsindonesia.or.id/laporan-kementerian-kesehatan-triwulan-kesatu-tahun-2012.html>
- Direktorat Jenderal Pengendalian Penyakit dan Penyehatan Lingkungan. (2011). *Perkembangan HIV/AIDS sampai dengan Triwulan II tahun 2011*. Dipetik Januari 24, 2012, dari Ditjen PP & PL Kementerian Kesehatan RI: http://www.pppl.depkes.go.id/asset/download/SITUASI_AIDS_TERKIN_I.pdf.
- Djoerban, Z., & Djauzi, S. (2006). HIV/AIDS di Indonesia. Dalam P. D. Indonesia, *Buku Ajar Ilmu Penyakit Dalam*. Jakarta: Pusat Penerbitan Departemen Ilmu Penyakit Dalam FK UI, 1803-1808.
- Donnelly, J. J., Wahren, B., & Liu, M. A. (2005). DNA Vaccines: Progress and Challenges. *J. Immunol.*, 175, 633-639.
- Fields, B. (2007). *Fields Virology*, 5th ed. Philadelphia: Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins.
- Esparza, J. (2001). An HIV Vaccine : how and when. *Bulletin of the World Health Organization*, 1133-1137.
- Girard, M. (1994). Human Immunodeficiency Virus. Dalam S. A. Plotkin, & E. A. Mortimer, *Vaccines*. Philadelphia: W.B. Saunders Company, 824.
- Girard, M. P., Osmanov, S., Assossou, O. M., & Kieny, M.-P. (2011). Human Immunodeficiency Virus (HIV) immunopathogenesis and vaccine development: A review. *Vaccine*, 29, 6191-6218.
- Hedestam, G. B., Fouchier, R. A., Phogat, S., Burton, D. R., Sodroski, J., & Wyatt, R. T. (2008). The challenges of eliciting neutralizing antibodies to HIV-1 and to influenza virus. *Nat. Rev. Microbiol.*, 6, 143-155.
- Holt, J. G., Krieg, N., Sneath, P., Stanley, J., & Williams, S. (1994). *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 9th.ed. Baltimore: William & Wilkins.

- Hope, T. J., & Trono, D. (2000). *Structure, Expression, and Regulation of the HIV Genome*. Dipetik 22 Januari, 2012, dari UCSF Center for HIV Information: <http://hivinsite.ucsf.edu/InSite?page=kb-02-01-02#S2X>.
- Kim, P. S., & Read, S. W. (2010). Nanotechnology and HIV: Potential Applications for Treatment and Prevention. *WIREs Nanomed Nanobiotechnol.*, 2, 693–702.
- Klatt, E. C. (2011). *Pathology of AIDS*. Savannah: Edward C. Klatt, MD.
- Komisi Penanggulangan AIDS Nasional. (2011). *Rangkuman Eksekutif Upaya Penanggulangan HIV dan AIDS di Indonesia 2006-2011*. Jakarta: Komisi Penanggulangan AIDS.
- Kresno, S. B. (2010). *Imunologi: Diagnosis dan Prosedur Laboratorium*. Jakarta: Badan Penerbit FK UI.
- Life Technologies Corporation. (2001). Dipetik 3 Juni, 2012, dari Invitrogen: www.protocol-online.org
- Life Technologies Corporation. (2012). *DNA and RNA Molecular Weights and Conversions*. Dipetik 3 Juni, 2012, dari Invitrogen: <http://www.invitrogen.com/site/us/en/home/References/Ambion-Tech-Support/rna-tools-and-calculators/dna-and-rna-molecular-weights-and-conversions.html>
- Merati, T. P., & Djauzi, S. (2006). Respon Imun Infeksi HIV. Dalam P. D. Indonesia, *Ilmu Penyakit Dalam*. Jakarta: Pusat Penerbitan Departemen Ilmu Penyakit Dalam FK UI, 272.
- Montero, M., van Houten, N. E., Wang, X., & Scott, J. K. (2008). The Membrane-Proximal External Region of the Human Immunodeficiency Virus Type 1 Envelope: Dominant Site of Antibody Neutralizing and Target for Vaccine Design. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 72, 54-84.
- Montgomery, D. L., Ulmer, J. B., Donnelly, J. J., & Liu, M. A. (1997). DNA Vaccines. *Pharmacol. Ther.*, 74, 195-205.
- Muster, T., Guinea, R., Trkola, A., Purtscher, M., Klima, A., & Steindl, F. (1994). Crossneutralizing activity against divergent human immunodeficiency virus type 1 isolates induced by the gp41 sequence ELDKWAS. *J. Virol.*, 68.
- National Institute of Allergy and Infectious Disease. (2011). *HIV/AIDS : Treatment of HIV Infection*. Dipetik 16 Januari, 2012, dari NIAID: <http://www.niaid.nih.gov/topics/HIVAIDS/Understanding/Treatment/Pages/Default.aspx>.

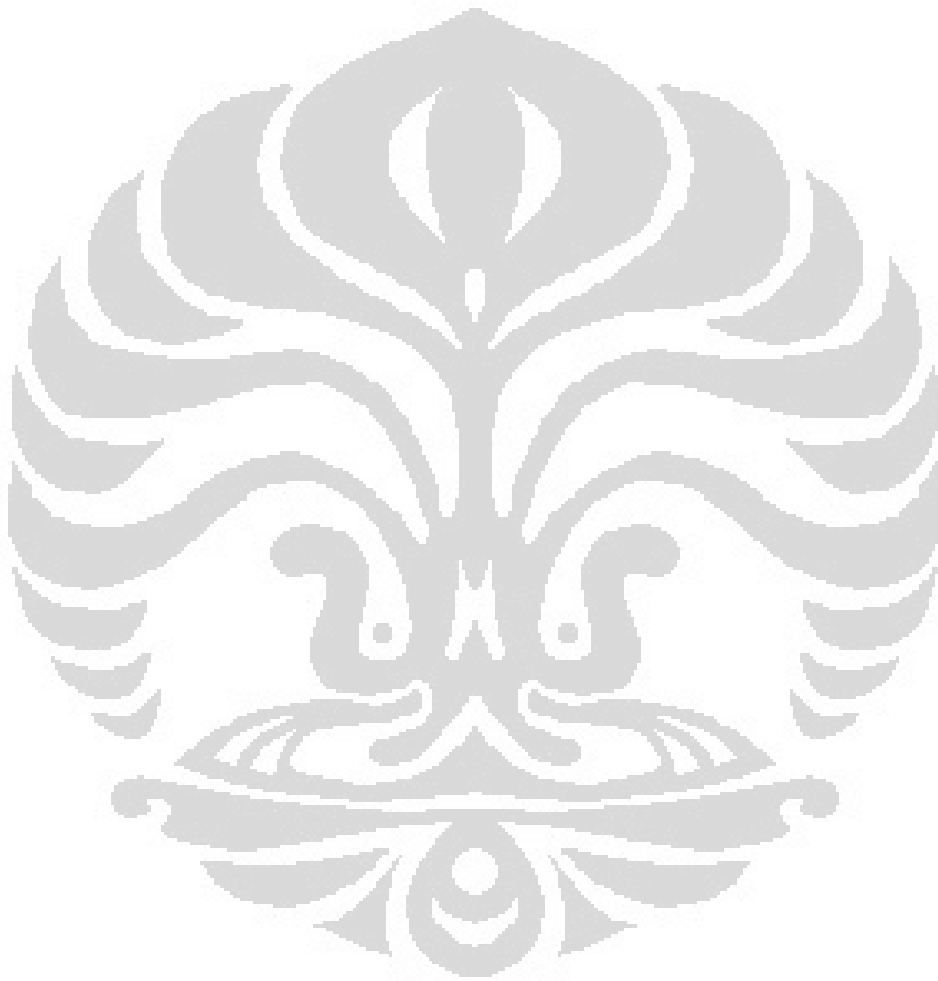
- National Institute of Allergy and Infectious Diseases. (2009). *HIV/AIDS: Biology of HIV*. Dipetik 16 Januari, 2012, dari NIAID: <http://www.niaid.nih.gov/topics/HIVAIDS/Understanding/Biology/Pages/biology.aspx>.
- Nettleman, M. (t.thn.). *HIV/AIDS*. Dipetik Januari 21, 2012, dari WebMD, Inc.: http://www.emedicinehealth.com/hivaids/page2_em.htm#HIV/AIDScauses.
- Perhimpunan Dokter Spesialis Penyakit Dalam Indonesia. (2006). *Ilmu Penyakit Dalam*. Jakarta: Pusat Penerbitan Departemen Ilmu Penyakit Dalam FK UI.
- Pusat Komunikasi Publik, Sekretariat Jenderal Kementerian Kesehatan RI. (2011). *Launching Hasil STBP, Pedoman, serta Modul Pengendalian HIV-AIDS dan IMS mendukung pengendalian HIV-AIDS yang Terstandarisasi*. Dipetik 23 Januari, 2012, dari Kementerian Kesehatan Republik Indonesia: <http://www.depkes.go.id/index.php/berita/press-release/1740-launching-hasil-stbp-pedoman-serta-modul-pengendalian-hiv-aids-dan-ims-mendukung-pengendalian-hiv-aids-yang-terstandarisasi.html>.
- QIAGEN. (2003). Appendix. Dalam QIAGEN, *The Bench Guide Protocols, hints, and tips for molecular biology labs*. QIAGEN, 88-100.
- QIAGEN. (2003). Plasmid DNA. Dalam QIAGEN, *The Bench Guide Protocols, hints, and tips for molecular biology labs*. QIAGEN, 1-20.
- QIAGEN. (2003). *QIAGEN Plasmid Purification Handbook*. QIAGEN.
- Ramezani, A., & Hawley, R. G. (2001). Overview of the HIV-1 Lentiviral Vector System. *Current Protocols in Molecular Biology*. Maryland, Washington, D. C., USA: John Wiley & Sons, Inc.
- Requejo, H. (2006). Worldwide molecular epidemiology of HIV. *Rev. Saude Publica*, 40, 45-331.
- Sahbandar, I. N., Takahashi, K., Djoerban, Z., Firmansyah, I., Naganawa, S., Motomura, K., et al. (2009, Juli 25). Current HIV type 1 molecular epidemiology profile and identification of unique recombinant forms in Jakarta, Indonesia. *AIDS Res Hum Retroviruses*, 637-46.
- Sahni, L. C., & Nagendra, C. A. (2004). HIV Vaccine Strategies - an Update. *MJAFI*, 157-164.
- Sambrook, J. & D.W. Russell. (2001). *Molecular cloning: A laboratory manual*, 3rd ed, Vol. 3. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Newyork, 1.13.

- Sardjito, R. (1994). Human Immunodeficiency Virus (HIV). Dalam S. P. Indonesia, *Buku Ajar Mikrobiologi Kedokteran, Edisi Revisi*. Jakarta: Binarupa Aksara, 397-412.
- Silman, E. (1994). Patogenesis dan Aspek Laboratorik Infeksi HIV-AIDS. Dalam K. K. UI, *Up-date Ilmu Penyakit Infeksi*. Jakarta: Balai Penerbit FK UI, 75-85.
- Subramani, P., Rajakannu, P., Sudhakar, P., & Jayaprakash, N. (2005). Targeting the HIV-1 Reverse Transcriptase, Integrase, P27, By Expression of RNAi Oligonucleotides from Engineered Human Artificial Chromosome, *Young Investigators*, 13. 6 . Dipetik 13 Februari 2012 dari <http://www.jyi.org/research/re.php?id=637>
- Susilo, B. (2006). Situasi HIV/AIDS di Indonesia Tahun 1987-2006. *Pusat Data dan Informasi Departemen Kesehatan RI*.
- The National Health Museum. (2009). *Winding Your Way Trough DNA*. Retrieved 12 Juni, 2012, from Access Excellence at The National Health Museum: http://www.accessexcellence.org/RC/AB/WYW/cohen/cohen_4.php
- Vical Inc. (2012). *Vaxfectin Adjuvant*. Dipetik 1 Juni, 2012, dari Vical: <http://www.vical.com/technology/formulations/vaxfectin/default.aspx>
- W., E. B., & Djauzi, S. (2006). Imunisasi Dewasa. Dalam P. D. Indonesia, *Buku Ajar Ilmu Penyakit Dalam Jilid I*. Jakarta: Pusat Penerbitan Departemen Ilmu Penyakit Dalam FK UI, 277-280.
- Walsh, G. (2007). *Pharmaceutical Biotechnology: Concept and Applications*. West Sussex: John Wiley & Sons Ltd.
- Widyarti, S. (2011). Elektroforesis Gel Poliakrilamida. Dalam Fatchiyah, E. L. Arumingtyas, S. Widyarti, & S. Rahayu, *Biologi Molekular: Prinsip Dasar Analisis*. Jakarta: Erlangga, 111-115.
- World Health Organization. (2012). *Health Topics : Vaccines*. Dipetik 25 Januari, 2012, dari World Health Organization: <http://www.who.int/topics/vaccines/en/>.
- World Health Organization. (2011). *Global health sector strategy on HIV/AIDS 2011-2015*. Perancis: WHO Press.
- World Health Organization. (2011). *HIV/ AIDS : Key facts on global HIV epidemic and progress in 2010*. Dipetik 24 Januari 2012, dari World Health Organization: http://www.who.int/hiv/pub/progress_report2011/global_facts/en/index.html

World of Microbiology and Immunology. (2003). *Hemagglutinin (HA) and Neuraminidase(NA)*. Dipetik 12 Februari 2012 dari Encyclopedia.com: <http://www.encyclopedia.com/doc/1G2-3409800267.html>

Wong-Staal, F. (2002). *AIDS Vaccine Research*. New York: Marcel Dekker.

Xiao-Nan Dong & Ying-Hua Chen. (2006). Neutralizing epitopes in the membrane-proximal region of HIV-1 gp41: Genetic variability and co-variation. *J. Imlet*, 106, 180-186.



Lampiran 1. Data Optimasi Konsentrasi Peptida ELDKWAS sebagai Antigen

		Pengenceran Serum							
		Sumuran	1	2	3	4	5	6	7
KONTROL (BASELINE) – SERUM 1	A	1: 12.5	1: 12.5	1:25	1:25	1:50	1:50	1:100	1:100
		15	15	15	15	15	15	15	15
	B	1: 12.5	1: 12.5	1:25	1:25	1:50	1:50	1:100	1:100
		12,5	12,5	12,5	12,5	12,5	12,5	12,5	12,5
	C	1: 12.5	1: 12.5	1:25	1:25	1:50	1:50	1:100	1:100
		10	10	10	10	10	10	10	10
	D	1: 12.5	1: 12.5	1:25	1:25	1:50	1:50	1:100	1:100
		7,5	7,5	7,5	7,5	7,5	7,5	7,5	7,5
UJI - SERUM 4	E	1: 12.5	1: 12.5	1:25	1:25	1:50	1:50	1:100	1:100
		15	15	15	15	15	15	15	15
	F	1: 12.5	1: 12.5	1:25	1:25	1:50	1:50	1:100	1:100
		12,5	12,5	12,5	12,5	12,5	12,5	12,5	12,5
	G	1: 12.5	1: 12.5	1:25	1:25	1:50	1:50	1:100	1:100
		10	10	10	10	10	10	10	10
	H	1: 12.5	1: 12.5	1:25	1:25	1:50	1:50	1:100	1:100
		7,5	7,5	7,5	7,5	7,5	7,5	7,5	7,5

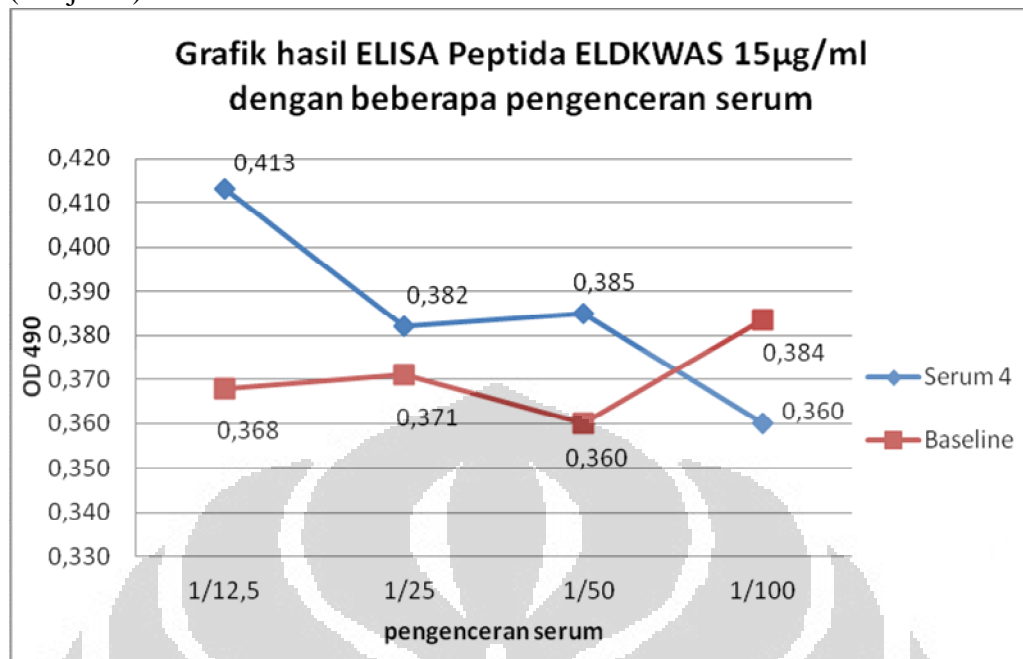
Keterangan: Angka dengan tulisan merah menunjukkan pengenceran serum yaitu 1/12,5; 1/25; 1/50; dan 1/100, sedangkan angka dengan tulisan hitam menunjukkan pengenceran peptida ELDKWAS yaitu 7,5 µg/ml; 10 µg/ml; 12,5 µg/ml; dan 15 µg/ml.

Gambar 4.6 Peta ELISA ketika optimasi peptida ELDKWAS

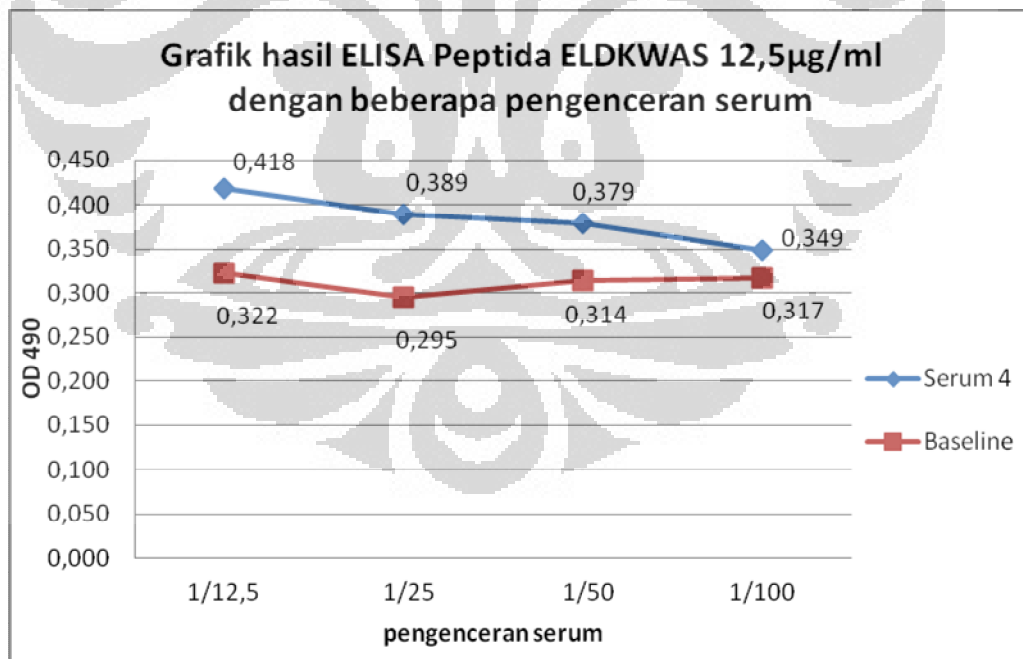
Tabel 4.1 Hasil pengukuran serapan berbagai konsentrasi peptida dengan beberapa pengenceran serum ke-1 dan ke-4 kelompok mencit divaksinasi DNA HA-MPER2 pada panjang gelombang 490 nm

1. ELDKWAS 15 µg/ml					3. ELDKWAS 10 µg/ml				
Serum ke-	1/12,5	1/25	1/50	1/100	Serum ke-	1/12,5	1/25	1/50	1/100
Serum 4	0,413	0,382	0,385	0,360	Serum 4	0,396	0,394	0,378	0,297
Baseline	0,368	0,371	0,360	0,384	Baseline	0,368	0,355	0,327	0,343
2. ELDKWAS 12,5 µg/ml					4. ELDKWAS 7,5 µg/ml				
Serum ke-	1/12,5	1/25	1/50	1/100	Serum ke-	1/12,5	1/25	1/50	1/100
Serum 4	0,418	0,389	0,379	0,349	Serum 4	0,403	0,391	0,349	0,361
Baseline	0,322	0,295	0,314	0,317	Baseline	0,401	0,379	0,353	0,365

(Lanjutan)

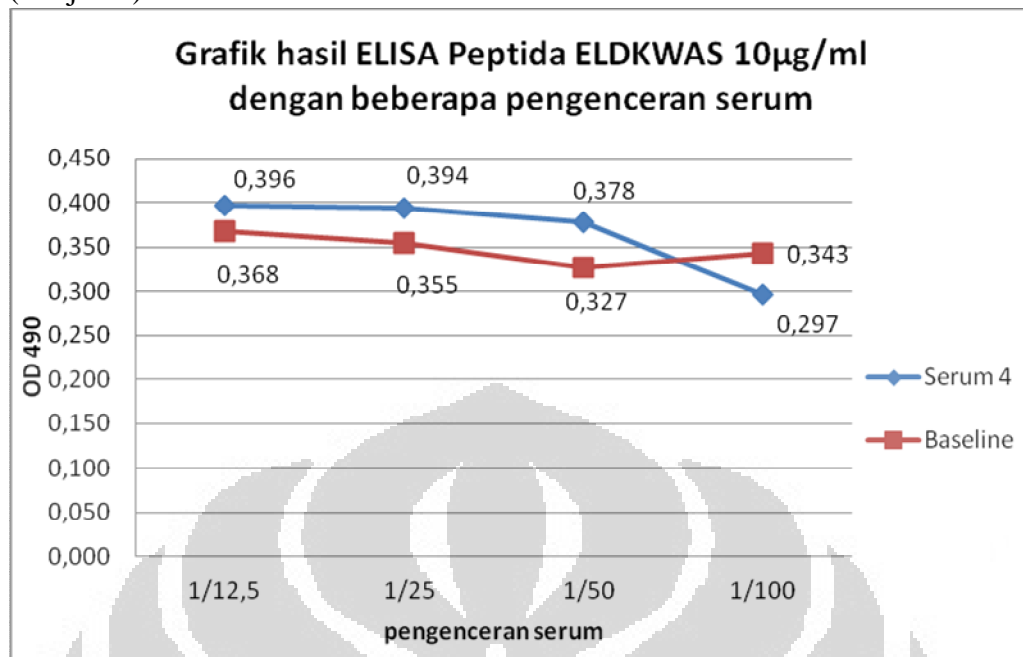


Gambar 4.7 Reaktivitas serum ke-4 dan serum ke-1 campuran semua mencit kelompok HA-MPER2 pada beberapa pengenceran terhadap peptida ELDKWAS 15 μ g/ml

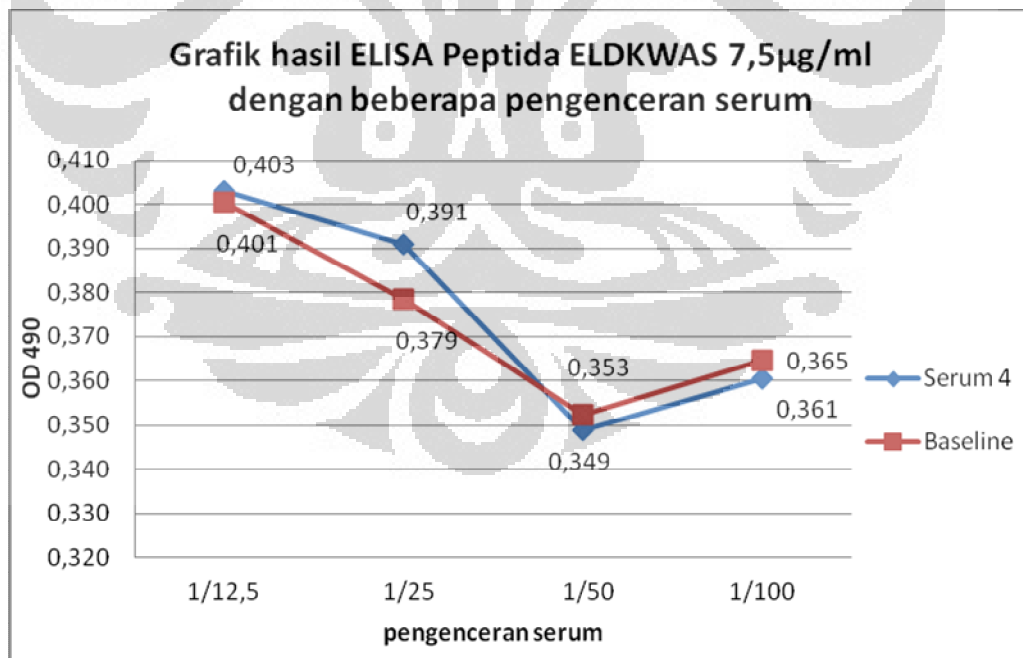


Gambar 4.8 Reaktivitas serum ke-4 dan serum ke-1 campuran semua mencit kelompok HA-MPER2 pada beberapa pengenceran terhadap peptida ELDKWAS 12,5 μ g/ml

(Lanjutan)



Gambar 4.9 Reaktivitas serum ke-4 dan serum ke-1 campuran semua mencit kelompok HA-MPER2 pada beberapa pengenceran terhadap peptida ELDKWAS 10 μ g/ml



Gambar 4.10 Reaktivitas serum ke-4 dan serum ke-1 campuran semua mencit kelompok HA-MPER2 pada beberapa pengenceran terhadap peptida ELDKWAS 7,5 μ g/ml

Lampiran 2. Optimasi Pengenceran Serum untuk Uji ELISA

		Pengenceran Serum					
	Sumuran	1	2	3	4	5	6
Baseline	A	12,5	12,5	12,5	12,5	12,5	12,5
		1/12,5	1/12,5	1/25	1/25	1/50	1/50
HA-MPER2	B	12,5	12,5	12,5	12,5	12,5	12,5
		1/12,5	1/12,5	1/25	1/25	1/50	1/50
HA	C	12,5	12,5	12,5	12,5	12,5	12,5
		1/12,5	1/12,5	1/25	1/25	1/50	1/50
WT	D	12,5	12,5	12,5	12,5	12,5	12,5
		1/12,5	1/12,5	1/25	1/25	1/50	1/50

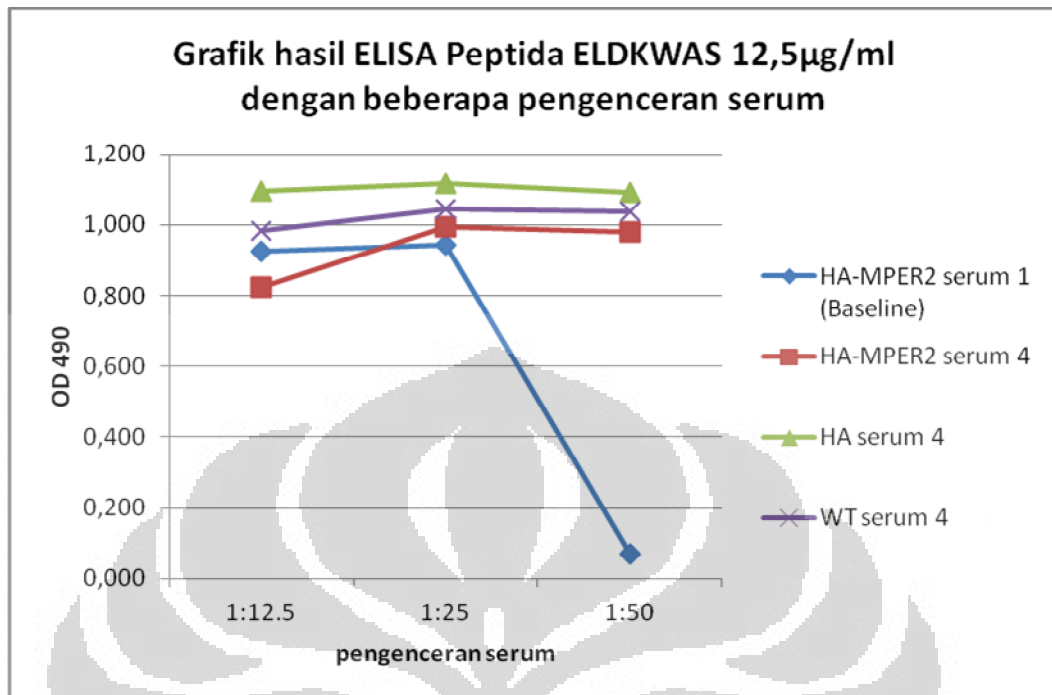
Keterangan: Angka dengan tulisan merah menunjukkan pengenceran serum yaitu 1/12,5; 1/25 dan 1/50; sedangkan angka dengan tulisan hitam menunjukkan konsentrasi peptida ELDKWAS yaitu 12,5 µg/ml.

Gambar 4.11 Peta ELISA ketika optimasi pengenceran serum

Tabel 4.2 Hasil pengukuran respon antibodi spesifik beberapa pengenceran serum mencit berbagai kelompok terhadap peptida ELDKWA 12,5 µg/ml pada panjang gelombang 490 nm

Pengenceran Serum Mencit	1:12.5	1:25	1:50
HA-MPER2 serum 1 (Baseline)	0,927	0,943	0,069
HA-MPER2 serum 4	0,823	0,995	0,978
HA serum 4	1,096	1,117	1,091
WT serum 4	0,985	1,046	1,038

(Lanjutan)



Gambar 4.12 Grafik respon antibodi beberapa pengenceran serum terhadap peptida ELDKWAS 12,5 μ g/ml

Lampiran 3. Uji ELISA pada Kontrol Negatif

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Kondisi a	← A												
Kondisi b	← B												
Kondisi c	← C												
	D												
Kondisi d	← E												
Kondisi e	← F												
Kondisi f	← G												
	H												

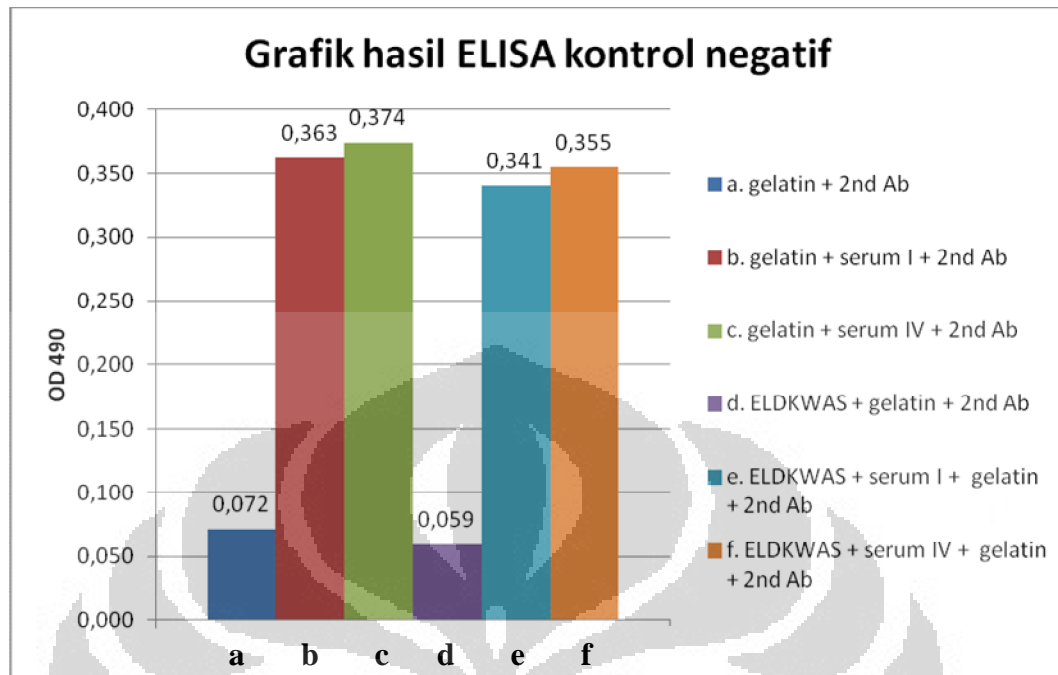
Keterangan: Kondisi a: gelatin+Ab kedua, kondisi b: gelatin+serum I+Ab kedua, kondisi c: gelatin+serum IV+Ab kedua, kondisi d: peptida ELDKWAS+gelatin+Ab kedua, kondisi e: peptida ELDKWAS+serum I+gelatin+Ab kedua, kondisi f: peptida ELDKWAS+serum IV+gelatin+Ab kedua. Gelatin merupakan bahan yang digunakan sebagai larutan *blocking*. Uji hanya dilakukan pada kolom 1 dan 2.

Gambar 4.13 Peta ELISA saat pengujian kontrol negatif

Tabel 4.3 Hasil pengukuran serapan berbagai perlakuan sebagai kontrol negatif pada panjang gelombang 490 nm

Perlakuan	Data 1	Data 2	rata-rata
a. gelatin + 2nd Ab	0,072	0,071	0,072
b. gelatin + serum I + 2nd Ab	0,357	0,368	0,363
c. gelatin + serum IV + 2nd Ab	0,374	0,374	0,374
d. ELDKWAS + gelatin + 2nd Ab	0,066	0,052	0,059
e. ELDKWAS + serum I + gelatin + 2nd Ab	0,349	0,332	0,341
f. ELDKWAS + serum IV + gelatin + 2nd Ab	0,361	0,349	0,355

(Lanjutan)



Gambar 4.14 Grafik yang menggambarkan hasil ELISA pada pengujian kontrol negatif

Lampiran 4. Hasil Optimasi Larutan *Blocking* dan Larutan Pengencer untuk Uji ELISA

Tabel 4.4 Hasil optimasi larutan *blocking* pada λ 490nm

Perlakuan		<i>blocking</i> 1% gelatin	<i>blocking</i> 2% gelatin
A	gelatin + 2nd Ab	0,068	0,093
B	ELDKWAS 12,5 μ g/ml + gelatin + 2nd Ab	0,075	0,099
C	ELDKWAS 15 μ g/ml + gelatin + 2nd Ab	0,069	0,156
D	HM I : serum I + ELDKWAS 15 + gelatin + 2nd Ab	0,362	0,362
E	HM I : serum IV + ELDKWAS 15 + gelatin + 2nd Ab	0,387	0,360
F	HM I : serum I + gelatin + 2nd Ab	0,393	0,384
G	HM I : serum IV + gelatin + 2nd Ab	0,394	0,399
H	HMII : serum I + ELDKWAS 12,5 + gelatin + 2nd Ab	0,355	0,322
I	HMII : serum IV + ELDKWAS 12,5 + gelatin + 2nd Ab	0,357	0,330
J	HMII : serum I + gelatin + 2nd Ab	0,359	0,324
K	HMII : serum IV + gelatin + 2nd Ab	0,355	0,339

Tabel 4.5 Hasil optimasi larutan pengencer pada λ 490nm

		<i>dilution</i> <i>buffer</i> 0,1%	<i>dilution</i> <i>buffer</i> 1%	<i>dilution</i> <i>buffer</i> 1,5%	<i>dilution</i> <i>buffer</i> 2%
A	gelatin + 2nd Ab	0,093	0,085	0,074	0,071
B	ELDKWAS 12,5 μ g/ml + gelatin + 2nd Ab	0,099	0,099	0,081	0,069
C	ELDKWAS 15 μ g/ml + gelatin + 2nd Ab	0,156	0,114	0,0755	0,073
D	HM I : serum I + ELDKWAS 15 + gelatin + 2nd Ab	0,362	0,315	0,271	0,284
E	HM I : serum IV + ELDKWAS 15 + gelatin + 2nd Ab	0,360	0,337	0,333	0,312
F	HM I : serum I + gelatin + 2nd Ab	0,384	0,356	0,324	0,301
G	HM I : serum IV + gelatin + 2nd Ab	0,399	0,358	0,337	0,324
H	HMII : serum I + ELDKWAS 12,5 + gelatin + 2nd Ab	0,322	0,264	0,261	0,248
I	HMII : serum IV + ELDKWAS 12,5 + gelatin + 2nd Ab	0,330	0,264	0,247	0,261
J	HMII : serum I + gelatin + 2nd Ab	0,324	0,272	0,286	0,277
K	HMII : serum IV + gelatin + 2nd Ab	0,339	0,274	0,267	0,257

Lampiran 5. Data Hasil Uji ELISA Serum Kelompok Mencit Divaksinasi DNA HA-MPER2

	mencit 1		rata-rata	mencit 2		rata-rata
serum I	0,3	0,308	0,304	0,314	0,337	0,3255
serum II	0,286	0,283	0,2845	0,396	0,387	0,3915
serum III	0,347	0,332	0,3395	0,403	0,408	0,4055
serum IV	0,282	0,258	0,27	0,286	0,282	0,284
	mencit 3		rata-rata	mencit 4		rata-rata
serum I	0,311	0,317	0,314	0,357	0,358	0,3575
serum II	0,325	0,324	0,3245	0,373	0,356	0,3645
serum III	0,398	0,37	0,384	0,386	0,381	0,3835
serum IV	0,277	0,261	0,269	0,305	0,274	0,2895
	mencit 5		rata-rata	mencit 6		rata-rata
serum I	0,318	0,316	0,317	0,29	0,263	0,2765
serum II	0,311	0,348	0,3295	0,369	0,373	0,371
serum III	0,38	0,372	0,376	0,381	0,38	0,3805
serum IV	0,292	0,29	0,291	0,32	0,305	0,3125

	mencit 1	mencit 2	mencit 3	mencit 4	mencit 5	mencit 6	rata-rata kelompok
serum I	0,304	0,326	0,314	0,358	0,317	0,277	0,316
serum II	0,285	0,392	0,325	0,365	0,330	0,371	0,344
serum III	0,340	0,406	0,384	0,384	0,376	0,381	0,378
serum IV	0,270	0,284	0,269	0,290	0,291	0,313	0,286

Lampiran 6. Data Hasil Uji ELISA Serum Kelompok Mencit Divaksinasi DNA HA-MPER1

	mencit 1		rata-rata	mencit 2		rata-rata
serum I	0,134	0,135	0,1345	0,193	0,195	0,194
serum II	0,263	0,217	0,24	0,288	0,286	0,287
serum III	0,399	0,311	0,355	0,31	0,311	0,3105
serum IV	0,365	0,339	0,352	0,287	0,316	0,3015
	mencit 3		rata-rata	mencit 4		rata-rata
serum I	0,345	0,35	0,3475	0,366	0,367	0,3665
serum II	0,353	0,338	0,3455	0,409	0,379	0,394
serum III	0,244	0,234	0,239	0,449	0,454	0,4515
serum IV	0,317	0,305	0,311	0,316	0,302	0,309
	mencit 5		rata-rata	mencit 6		rata-rata
serum I	0,285	0,278	0,2815	0,321	0,3	0,3105
serum II	0,207	0,223	0,215	0,401	0,366	0,3835
serum III	0,367	0,364	0,3655	0,394	0,387	0,3905
serum IV	0,35	0,354	0,352	0,34	0,343	0,3415

	mencit 1	mencit 2	mencit 3	mencit 4	mencit 5	mencit 6	rata-rata kelompok
serum I	0,135	0,194	0,348	0,367	0,282	0,311	0,272
serum II	0,240	0,287	0,346	0,394	0,215	0,384	0,311
serum III	0,355	0,311	0,239	0,452	0,366	0,391	0,352
serum IV	0,352	0,302	0,311	0,309	0,352	0,342	0,328

Lampiran 7. Data Hasil Uji ELISA Serum Kelompok Mencit Divaksinasi DNA HA

	mencit 1		rata-rata	mencit 2		rata-rata
serum I	0,438	0,441	0,4395	0,387	0,363	0,375
serum II	0,353	0,328	0,3405	0,385	0,349	0,367
serum III	0,402	0,393	0,3975	0,43	0,377	0,4035
serum IV	0,44	0,415	0,4275	0,439	0,383	0,411
	mencit 3		rata-rata	mencit 4		rata-rata
serum I	0,345	0,333	0,339	0,282	0,29	0,286
serum II	0,339	0,334	0,3365	0,34	0,341	0,3405
serum III	0,274	0,276	0,275	0,393	0,404	0,3985
serum IV	0,305	0,295	0,3	0,355	0,429	0,392
	mencit 5		rata-rata	mencit 6		rata-rata
serum I	0,394	0,365	0,3795	0,314	0,361	0,3375
serum II	0,346	0,342	0,344	0,284	0,266	0,275
serum III	0,309	0,351	0,33	0,43	0,431	0,4305
serum IV	0,436	0,426	0,431	0,345	0,339	0,342

	mencit 1	mencit 2	mencit 3	mencit 4	mencit 5	mencit 6	rata-rata kelompok
serum I	0,440	0,375	0,339	0,286	0,380	0,338	0,359
serum II	0,341	0,367	0,337	0,341	0,344	0,275	0,334
serum III	0,398	0,404	0,275	0,399	0,330	0,431	0,373
serum IV	0,428	0,411	0,300	0,392	0,431	0,342	0,384

Lampiran 8. Data Hasil Uji ELISA Serum Kelompok Mencit Divaksinasi DNA *wildtype*

	mencit 1		rata-rata	mencit 2		rata-rata
serum I	0,318	0,304	0,311	0,353	0,31	0,3315
serum II	0,341	0,308	0,3245	0,291	0,284	0,2875
serum III	0,305	0,309	0,307	0,315	0,314	0,3145
serum IV	0,222	0,222	0,222	0,282	0,278	0,28
	mencit 3		rata-rata	mencit 4		rata-rata
serum I	0,345	0,341	0,343	0,247	0,244	0,2455
serum II	0,347	0,33	0,3385	0,281	0,276	0,2785
serum III	0,315	0,322	0,3185	0,309	0,316	0,3125
serum IV	0,307	0,311	0,309	0,226	0,219	0,2225
	mencit 5		rata-rata	mencit 6		rata-rata
serum I	0,4	0,438	0,419	0,466	0,424	0,445
serum II	0,388	0,381	0,3845	0,392	0,399	0,3955
serum III	0,382	0,377	0,3795	0,334	0,382	0,358
serum IV	0,307	0,282	0,2945	0,278	0,255	0,2665

	mencit 1	mencit 2	mencit 3	mencit 4	mencit 5	mencit 6	rata-rata kelompok
serum I	0,311	0,332	0,343	0,246	0,419	0,445	0,349
serum II	0,325	0,288	0,339	0,279	0,385	0,396	0,335
serum III	0,307	0,315	0,319	0,313	0,380	0,358	0,332
serum IV	0,222	0,280	0,309	0,223	0,295	0,267	0,266

Lampiran 9. Hasil analisis statistik

1. Serum I

A. Uji Normalitas

Ho = Data terdistribusi normal

Hi = Data tidak terdistribusi normal

Interpretasi hasil uji :

$p < 0,05$ maka Ho ditolak

$p > 0,05$ maka Ho diterima

Hasil :

Tests of Normality						
serum_1	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
OD_1 1	,200	6	,200*	,957	6	,797
2	,182	6	,200*	,968	6	,877
3	,190	6	,200*	,968	6	,878
4	,207	6	,200*	,921	6	,515

a. Lilliefors Significance Correction

*. This is a lower bound of the true significance.

Kesimpulan : $p > 0,05$, maka data terdistribusi normal

B. Uji ANOVA

Ho = tidak ada perbedaan respon antibodi antar kelompok pada serum I

Hi = ada perbedaan respon antibodi antar kelompok pada serum I

Interpretasi hasil uji :

$p < 0,05$ maka Ho ditolak

$p > 0,05$ maka Ho diterima

Hasil :

ANOVA

OD_1

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	,028	3	,009	2,185	,121
Within Groups	,085	20	,004		
Total	,112	23			

Kesimpulan : $p > 0,05$ maka tidak ada perbedaan respon antibodi antar kelompok pada serum I

(Lanjutan)

2. Serum II

A. Uji Normalitas

Ho = Data terdistribusi normal

Hi = Data tidak terdistribusi normal

Interpretasi hasil uji :

$p < 0,05$ maka Ho ditolak

$p > 0,05$ maka Ho diterima

Hasil :

		Tests of Normality					
		Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
serum_2		Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
OD_2	1	,181	6	,200*	,920	6	,509
	2	,367	6	,011	,788	6	,046
	3	,199	6	,200*	,957	6	,799
	4	,178	6	,200*	,915	6	,470

a. Lilliefors Significance Correction

*. This is a lower bound of the true significance.

Kesimpulan : $p < 0,05$ maka data tidak terdistribusi normal

B. Uji Kruskal Wallis

Ho = tidak ada perbedaan respon antibodi antar kelompok pada serum II

Hi = ada perbedaan respon antibodi antar kelompok pada serum II

Interpretasi hasil uji :

$p < 0,05$ maka Ho ditolak

$p > 0,05$ maka Ho diterima

(Lanjutan)

Hasil :

	serum_2	N	Mean Rank
OD_2	1	6	12,75
	2	6	12,33
	3	6	13,58
	4	6	11,33
	Total	24	

	OD_2
Chi-Square	,315
Df	3
Asymp. Sig.	,957

a. Kruskal Wallis Test

b. Grouping Variable: serum_2

Kesimpulan : $p > 0,05$ maka tidak ada perbedaan respon antibodi antar kelompok pada serum II

3. Serum III

A. Uji Normalitas

Ho = Data terdistribusi normal

Hi = Data tidak terdistribusi normal

Interpretasi hasil uji :

$p < 0,05$ maka Ho ditolak

$p > 0,05$ maka Ho diterima

(Lanjutan)

Hasil :

Tests of Normality							
serum_3		Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
OD_3	1	,338	6	,031	,806	6	,067
	2	,330	6	,040	,862	6	,195
	3	,293	6	,117	,873	6	,237
	4	,183	6	,200 [*]	,982	6	,963

a. Lilliefors Significance Correction

*. This is a lower bound of the true significance.

Kesimpulan : $p > 0,05$ maka data terdistribusi normal

B. Uji ANOVA

Ho = tidak ada perbedaan respon antibodi antar kelompok pada serum III

Hi = ada perbedaan respon antibodi antar kelompok pada serum III

Interpretasi hasil uji :

$p < 0,05$ maka Ho ditolak

$p > 0,05$ maka Ho diterima

Hasil :

ANOVA

OD_3					
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	,008	3	,003	1,086	,378
Within Groups	,050	20	,002		
Total	,058	23			

Kesimpulan : $p > 0,05$ maka tidak ada perbedaan respon antibodi antar kelompok pada serum III

(Lanjutan)

4. Serum IV

A. Uji Normalitas

Ho = Data terdistribusi normal

Hi = Data tidak terdistribusi normal

Interpretasi hasil uji :

$p < 0,05$ maka Ho ditolak

$p > 0,05$ maka Ho diterima

Hasil :

Tests of Normality						
Serum_4	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
OD_4 1	,215	6	,200*	,895	6	,344
2	,228	6	,200*	,881	6	,273
3	,211	6	,200*	,916	6	,475
4	,266	6	,200*	,830	6	,108

a. Lilliefors Significance Correction

*. This is a lower bound of the true significance.

Test of Homogeneity of Variance					
		Levene Statistic	df1	df2	Sig.
OD_4	Based on Mean	3,686	3	20	,029
	Based on Median	1,838	3	20	,173
	Based on Median and with adjusted df	1,838	3	9,104	,210
	Based on trimmed mean	3,298	3	20	,041

Kesimpulan : $p < 0,05$ maka data tidak terdistribusi normal

B. Uji Kruskal Wallis

Ho = tidak ada perbedaan respon antibodi antar kelompok pada serum IV

Hi = ada perbedaan respon antibodi antar kelompok pada serum IV

Interpretasi hasil uji :

$p < 0,05$ maka Ho ditolak

$p > 0,05$ maka H_0 diterima

Hasil :

Ranks			
	Serum_4	N	Mean Rank
OD_4	1	6	5,92
	2	6	19,83
	3	6	8,17
	4	6	16,08
	Total	24	

Test Statistics ^{a,b}	
	OD_4
Chi-Square	15,462
Df	3
Asymp. Sig.	,001

a. Kruskal Wallis Test

b. Grouping Variable: Serum_4

Kesimpulan : $p < 0,05$ maka ada perbedaan respon antibodi antar kelompok pada serum IV

Lampiran 10. COA Peptida ELDKWAS

		Peptide Synthesis Report			
1st BASE Pte Ltd 41 Science Park Road, #01-22 / 23 / 28 The Gemini, Singapore Science Park II Singapore 117610 T: +65-6775 7318 F: +65-6775 7211 E: peptide-sg@base-asia.com					
PT. Genetika Science Indonesia Jln. Duri Raya No 5D, Jakarta Barat 11510, Indonesia Attn : Wiardi Lukito Tel : (62) 021-569821 37/38			Order ID : 173648 PO Number : PTGEN-3098 Report Date : 10 th May 2012		
CERTIFICATE OF ANALYSIS					
Product Name		Peptide			
Order ID		DO 173648			
Lot No.		LT120423-LT167823			
Sequence		ELDKWAS			
Modification		-			
Length		7AA			
Storage		-20°C			
Test Items		Specifications		Results	
Molecular Weight		Theoretical MW: 847.93		Consistent	
HPLC purity		>70% Purity (HPLC)		82.88%	
Appearance		White Powder		Conforms	
Quantity		15mg yield		15.2mg	
Approved By:					
Peptide Synthesis Officer 1st BASE Pte Ltd					

Lampiran 11. Dokumentasi imunisasi (A) dan pengambilan darah (B) mencit

