



**UNIVERSITAS INDONESIA**

**ANALISIS RESPONS ANTIBODI MPER-gp41 HIV-1 PADA  
MENCIT BALB/c YANG DIIMUNISASI VAKSIN DNA HA-  
MPER-1 HIV-1**

**SKRIPSI**

**WINIE KARUNIA RAHMANI  
0806398814**

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



**UNIVERSITAS INDONESIA**

**ANALISIS RESPONS ANTIBODI MPER-gp41 HIV-1 PADA  
MENCIT BALB/c YANG DIIMUNISASI VAKSIN DNA HA-  
MPER-1 HIV-1**

**SKRIPSI**

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

**WINIE KARUNIA RAHMANI  
0806398814**

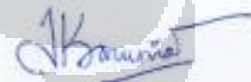
**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM  
PROGRAM STUDI FARMASI  
DEPOK  
JULI 2012**

## **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



Winie Karunia Rahmani

## 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 Winie Karunia Rahmani

NPM 0806398814

Tanda Tangan 

Tanggal 12 Juli 2012

## HALAMAN PENGESAHAN

Skripsi ini diajukan oleh :  
Nama : Winie Karunia Rahmani  
NPM : 0806398814  
Program Studi : Sarjana Farmasi  
Judul Skripsi : Analisis Respons Antibodi MPER-gp41 HIV-1 pada Mencit BALB/c yang Dimunisasi Vaksin DNA HA-MPER-1 HIV-1

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

### DEWAN PENGUJI

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

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

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

Penguji II : Dr. Berna Elya, Apt., M.Si

Ditetapkan di : Depok  
Tanggal : 11 Juli 2012

## KATA PENGANTAR

Segala puji dan syukur penulis panjatkan kehadirat Allah SWT, atas berkat dan rahmat-Nya, penulis dapat menyelesaikan penelitian dan penyusunan skripsi ini.

Skripsi ini disusun sebagai salah satu syarat untuk mencapai gelar Sarjana Farmasi di Departemen Farmasi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Indonesia. Penulis menyadari bahwa tanpa bantuan dan bimbingan dari berbagai pihak, sangatlah sulit bagi penulis untuk menyelesaikan skripsi ini. Oleh karena itu, penulis mengucapkan terima kasih kepada

1. Dr.dr Budiman Bela, Sp.MK (K) dan Prof. Maksum Radji, Apt., M.Biomed, Ph.D selaku dosen pembimbing yang telah menyediakan waktu, tenaga, dan pikiran untuk mengarahkan saya dalam penyusunan skripsi ini,
2. Dr. Berna Elya, Apt., M.Si selaku pembimbing akademik yang telah memberikan bimbingan selama penulis menempuh pendidikan di Departemen Farmasi FMIPA UI,
3. Prof. Dr Yahdiana Harahap, M. Si, selaku Ketua Departemen Farmasi
4. Dr. Fera Ibrahim selaku Ketua Laboratorium Institute of Human Virology and Cancer Biology University of Indonesia
5. Prof. Maksum Radji, M. Biomed., Ph.D., Apt. selaku Ketua Laboratorium Mikrobiologi Departemen Farmasi FMIPA UI,
6. Para dosen yang telah memberikan ilmu pengetahuan selama menempuh pendidikan di Departemen Farmasi FMIPA UI,
7. Drh. Silvia, supervisor IHVCB-UI, yang telah membantu saya selama penelitian di IHVCB UI,
8. Orang tua saya yaitu Misnie dan Pudji Wiyanti serta adik saya Annisha Rahmani dan Mar'ie Muhamad Akbar yang telah memberikan bantuan dukungan materiil dan moral;
9. Nurul Hasanah, dr Ratna, Kak Nada, teman-teman seperjuangan di ruang DNA, yang sangat setia menemani dikala suka dan duka.
10. Teman-teman IHVCB-UI, Kak Andreas, Kak Atep, Kak Kober, Kak Eka, Revi, Puji, Atif, Cyntia, Pak Catur, Bu Sofy, Bu Heni, Mba Wuri, Ibu Aroem,

Mba Yuli, Kak Rio, yang telah banyak memberi warna, pengalaman serta ilmu yang sangat bermanfaat selama penelitian di IHVCB-UI.

- 11 Sahabat-sahabat saya, Majang, Anes, Bian, Nita, Sudep, Thia, Novia, yang selalu memberikan informasi sekitar kampus selama saya meneliti di IHVCB-UI
12. Keluarga besar CT HMD Farmasi UI 2010 yang telah banyak memberikan semangat dikala suka dan duka , dan
13. Saudara-saudara saya, Mbah nik, mbah ijah, Bude Nanik, Pakde Joko, Tante Yuyun, Om Anggie, Tante Leha, Om Tomo, Mbak Mera, Mba Beaty dan mba Nuning yang telah memberikan saya semangat dan motivasi dalam 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 pengetahuan di masa yang akan datang.

Penulis

2012

**HALAMAN PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI  
TUGAS AKHIR UNTUK KEPENTINGAN AKADEMIS**

---

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

Nama	Winie Karunia Rahmani
NPM	0806398814
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 Respons Antibodi MPER-gp41 HIV-1 pada Mencit BALB/c yang Diimunisasi Vaksin DNA HA-MPER-1 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

  
(Winie Karunia Rahmani)



## ABSTRAK

Nama : Winie Karunia Rahmani  
Program Studi : Farmasi  
Judul : Analisis Respons Antibodi MPER-gp41 HIV-1 pada Mencit BALB/c yang Diimunisasi Vaksin DNA HA-MPER-1 HIV-1

Penggunaan vaksin DNA untuk kasus HIV merupakan suatu usaha untuk menghasilkan respons imun humoral dan selular dalam tubuh. *Membrane-proximal external region* (MPER) gp41 merupakan salah satu target utama untuk menginduksi antibodi netralisasi. Tetapi, MPER merupakan imunogenik lemah. Oleh karena itu, pada penelitian sebelumnya, epitop MPER disisipkan dalam situs antigenik 1 gen HA dari virus Influenza H5N1. Tujuan penelitian ini adalah untuk menilai respons antibodi spesifik MPER-gp41 pada mencit BALB/c yang diimunisasi vaksin DNA HA-MPER-1. Plasmid DNA diproduksi skala besar untuk diformulasikan dengan DMRIE-c. Perbandingan molaritas DMRIE-c dan DNA yaitu 2:1. Mencit BALB/c betina diimunisasi vaksin pcDNA3.1 HA-MPER-1 dengan dosis tunggal 50 µg secara intramuskular. Jadwal imunisasi dilakukan pada minggu ke 2, 4 dan 6 dan sampel serum diambil sebelum masing-masing penyuntikan. Sampel serum dianalisis dengan menggunakan teknik ELISA peptida. Hasil uji statistik dengan menggunakan uji ANOVA menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan antara kelompok vaksin pcDNA3.1 *wildtype*, vaksin pcDNA3.1 HA-MPER-1 ( $p=0,014$ ) dalam kelompok serum mencit BALB/c ke IV. Walaupun demikian, pada penelitian ini tidak ada respon antibodi spesifik MPER-gp41 pada serum mencit BALB/c yang diimunisasi vaksin DNA HA-MPER-1.

Kata Kunci : HIV-1, Vaksin DNA, MPER, Imunisasi, ELISA  
xvi+101 halaman: 29 gambar; 8 tabel ; 17 Lampiran  
Daftar Pustaka : 71 (1988-2012)

## ABSTRACT

Name : Winie Karunia Rahmani  
Program Study : Pharmacy  
Title : Analysis of Antibody Response MPER-gp41 HIV-1 in BALB/c mice immunized DNA Vaccine HA-MPER-1 HIV-1

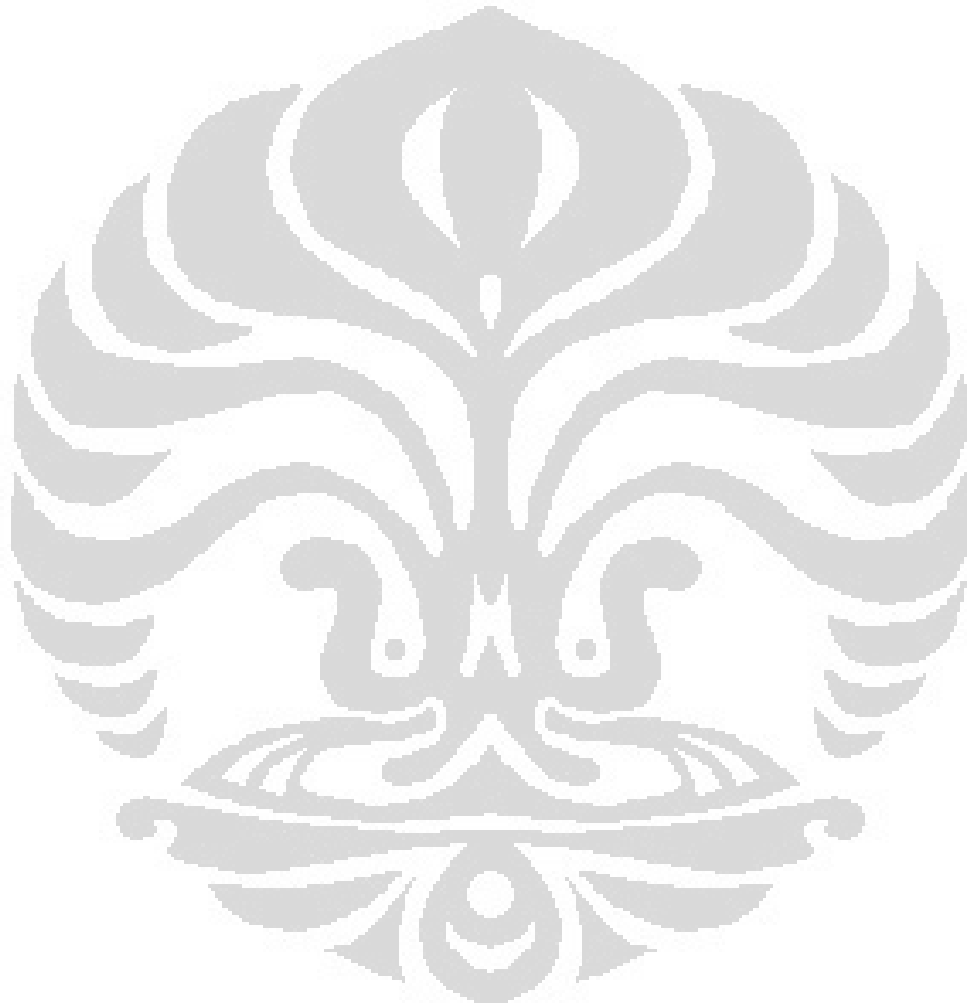
The utilizing of DNA vaccine for HIV's case is an effort to elicit humoral and cellular immune responses in the body. Membrane-Proximal External Region (MPER) of gp41 is one of prime target for the induction neutralizing antibodies. But MPER is weak immunogenicity. Therefore, the previous research, epitope MPER was inserted at antigenic site 1 of gene HA from virus influenza H5N1. The purpose of this research is to assess specific antibody response MPER-gp41 in BALB/c mice immunized DNA vaccine HA-MPER-1. DNA plasmid was produced in scale up to be formulated with DMRIE-c. The molar ratio of DMRIE-c and DNA is 2:1. Female BALB/c mice was immunized intramuscularly DNA vaccine pcDNA3.1 HA-MPER-1 with single dose 50 µg. The immunization schedule was carried out at week 2, 4 and 6 and serum samples were collected at before each inoculation. Serum samples were analyzed by peptide ELISA technique. The result of statistic test with ANOVA test showed that there are difference significant level between pcDNA3.1 wildtype and pcDNA3.1 HA-MPER-1 ( $p=0,014$ ) in fourth serum of BALB/c mice. Although, in this research there was no specific antibody response MPER-gp41 in BALB/c mice immunized DNA vaccine HA-MPER-1.

Key Word : HIV-1, DNA Vaccine, MPER, Immunization, ELISA  
xvi+101 pages : 29 pictures; 8 tables; 17 appendixes  
Bibliography : 71 (1988-2012)

## DAFTAR ISI

HALAMAN SAMPUL .....	i
HALAMAN JUDUL .....	ii
SURAT PERNYATAAN BEBAS PLAGIARISME .....	iii
HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS .....	iv
HALAMAN PENGESAHAN .....	v
KATA PENGANTAR .....	vi
HALAMAN PERSETUJUAN PUBLIKASI KARYA ILMIAH .....	viii
ABSTRAK .....	ix
ABSTACT .....	x
DAFTAR ISI .....	xi
DAFTAR GAMBAR .....	xiii
DAFTAR TABEL .....	xv
DAFTAR LAMPIRAN .....	xvi
<b>BAB 1. PENDAHULUAN .....</b>	<b>1</b>
1.1. Latar Belakang .....	1
1.2. Tujuan Penelitian .....	4
1.3. Manfaat Penelitian .....	5
<b>BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA .....</b>	<b>6</b>
2.1. <i>Human Immunodeficiency Virus</i> (HIV) .....	6
2.2. Imunogen dan Antigen .....	10
2.3. Antibodi .....	15
2.4. <i>Escherchia coli</i> TOP 10 .....	16
2.5. Plasmid pcDNA3.1 (+) .....	17
2.6. Vaksin .....	18
2.7. Transformasi Plasmid DNA .....	21
2.8. Isolasi DNA Rekombinan .....	21
2.9. Elektroforsis Jel .....	22
2.10. Imunisasi .....	23
2.11. <i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i> (ELISA) .....	24
2.12. Analisis Data .....	25
<b>BAB 3. METODE PENELITIAN .....</b>	<b>27</b>
3.1. Tempat dan Waktu Penelitian .....	27
3.2. Alat .....	27
3.3. Bahan .....	27
3.4. Prosedur Kerja .....	29
<b>BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN .....</b>	<b>42</b>
4.1. Pembuatan <i>E.coli</i> TOP 10 Kompeten dan Transformasi Sel .....	42
4.2. Isolasi Plasmid .....	44
4.3. Visualisasi Hasil Isolasi dan Konfirmasi Hasil Isolasi dengan Sekuensing .....	46
4.4. Imunisasi Vaksin .....	50
4.5. <i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i> (ELISA) .....	51

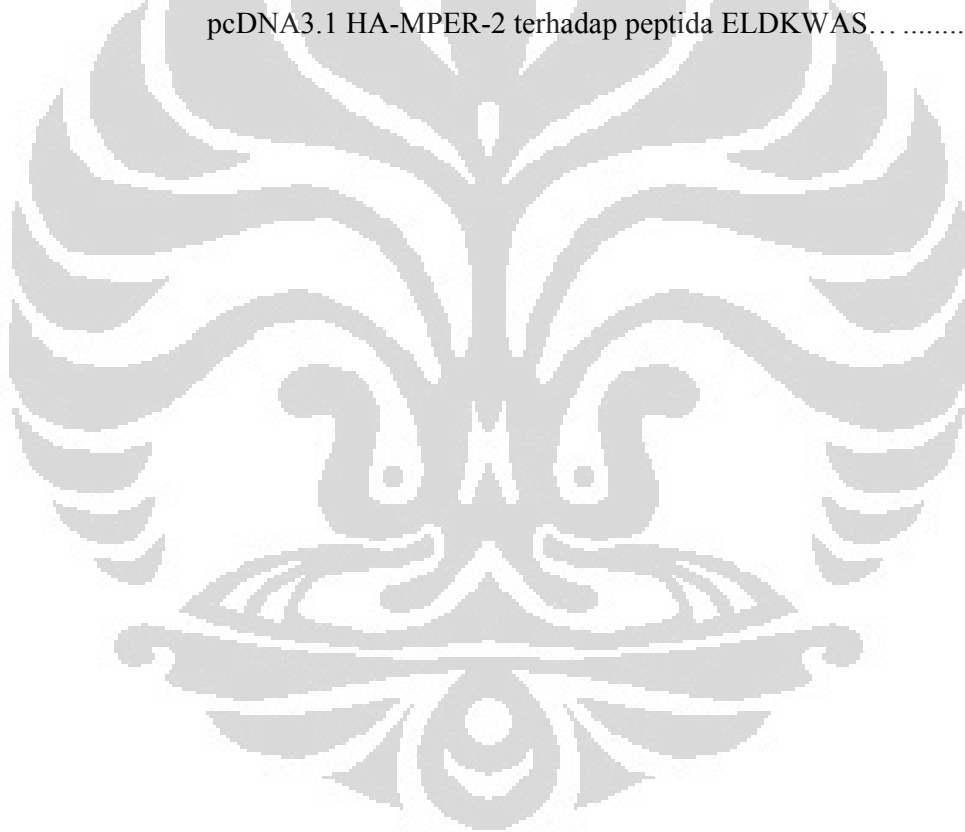
4.6. Respons Imun Humoral Mencit BALB/c terhadap peptida ELDKWAS diinduksi oleh pemberian vaksin DNA .....	59
4.7. Analisis Respons Imun Humoral Mencit BALB/c terhadap peptida ELDKWAS dihasilkan oleh vaksin DNA .....	65
<b>BAB 5. KESIMPULAN DAN SARAN .....</b>	<b>68</b>
5.1. Kesimpulan .....	68
5.2. Saran .....	68
<b>DAFTAR ACUAN .....</b>	<b>69</b>



## DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1.	Struktur HIV .....	7
Gambar 2.2.	Siklus virus HIV .....	9
Gambar 2.3.	Struktur gp41 .....	13
Gambar 2.4.	Struktur virus Influenza.....	14
Gambar 2.5.	Peta plasmid pcDNA3.1 (+/-).....	17
Gambar 3.1.	Skema kerja penelitian .....	29
Gambar 3.2.	Skema pembuatan sel <i>E.coli</i> TOP 10 Kompeten.....	30
Gambar 3.3.	Skema transformasi plasmid rekombinan .....	31
Gambar 3.4.	Skema isolasi plasmid skala kecil.....	32
Gambar 3.5.	Skema isolasi plasmid skala besar .....	34
Gambar 4.1.	Hasil transformasi sel dalam plate agar ampisillin .....	43
Gambar 4.2.	Visualisasi dengan elektroforesis agarosa 0,8% hasil isolasi skala kecil dari 5 koloni terpilih hasil transformasi pada kelompok pcDNA3.1 <i>wildtype</i> , pcDNA3.1 HA, pcDNA3.1 HA-MPER-1 .....	47
Gambar 4.3.	Visualisasi hasil isolasi skala kecil dibandingkan dengan hasil digest dengan enzim Hind III [Fermentas] dilihat dengan elektroforesis agarosa 0,8% .....	48
Gambar 4.4.	Visualisasi hasil isolasi skala besar dengan elektroforesis agarosa 0,8% dengan konsentrasi plasmid 50 ng/ $\mu$ L .....	49
Gambar 4.5.	Imunisasi vaksin plasmid DNA rekombinan pada otot paha mencit BALB/c betina .....	50
Gambar 4.6.	Grafik hasil optimasi ELISA penentuan konsentrasi peptida ELDKWAS dari hasil optimasi ELISA dengan menggunakan variasi konsentrasi peptida 15; 12,5; 10 dan 7,5 $\mu$ g/mL .....	52
Gambar 4.7.	Grafik hasil optimasi ELISA penentuan konsentrasi serum mencit antara serum sebelum diimunisasi vaksin pcDNA3.1 HA-MPER-1 dengan serum sesudah divaksinasi <i>booster</i> ke-2 dengan menggunakan konsentrasi peptida 15 $\mu$ g/mL.....	54
Gambar 4.8.	Grafik hasil optimasi ELISA pada konsentrasi peptida 15 $\mu$ g/mL pada kelompok serum HA-MPER-1 sebelum diimunisasi vaksin pcDNA3.1 HA-MPER-1 (baseline), kelompok serum pcDNA3.1 HA-MPER-1 <i>booster</i> kedua, kelompok serum HA setelah diimunisasi vaksin pcDNA3.1 HA <i>booster</i> kedua, dan kelompok vaksin pcDNA3.1 <i>wildtype</i> .....	55
Gambar 4.9.	Grafik hasil optimasi ELISA penentuan reaktivitas peptida terhadap beberapa kelompok perlakuan dengan atau tanpa serum mencit sebelum diimunisasi vaksin pcDNA3.1 HA-MPER-1 dengan serum sesudah divaksinasi <i>booster</i> ke-2 dengan menggunakan konsentrasi serum 1/25 pada konsentrasi peptida 15 $\mu$ g/mL.....	56
Gambar 4.10.	Grafik hasil optimasi ELISA perbandingan antara <i>blocking buffer</i> 1% gelatin dengan <i>blocking buffer</i> 2%.....	57
Gambar 4.11.	Grafik hasil optimasi ELISA perbandingan antara perlakuan dengan dilution buffer 0,1 %, 1%, 1,5% dan 2% .....	58

Gambar 4.12	Grafik reaktivitas serum mencit divaksinasi vaksin DNA pcDNA3.1 <i>wildtype</i> terhadap peptida ELDKWAS.....	59
Gambar 4.13	Grafik rata-rata reaktivitas serum mencit divaksinasi vaksin pcDNA3.1 <i>wildtype</i> terhadap peptida ELDKWAS.....	60
Gambar 4.14	Grafik reaktivitas serum mencit divaksinasi vaksin DNA pcDNA3.1 HA terhadap peptida ELDKWAS.....	61
Gambar 4.15	Grafik rata-rata reaktivitas serum mencit divaksinasi vaksin DNA pcDNA3.1 HA terhadap peptida ELDKWAS .....	61
Gambar 4.16	Grafik reaktivitas serum mencit divaksinasi vaksin DNA pcDNA3.1 HA-MPER-1 terhadap peptida ELDKWAS.....	62
Gambar 4.17	Grafik rata-rata reaktivitas serum mencit divaksinasi vaksin DNA pcDNA3.1 HA-MPER-1 terhadap peptida ELDKWAS.....	63
Gambar 4.18	Grafik reaktivitas serum mencit divaksinasi vaksin DNA pcDNA3.1 HA-MPER-2 terhadap peptida ELDKWAS.....	64
Gambar 4.19	Grafik rata-rata reaktivitas serum mencit divaksinasi vaksin DNA pcDNA3.1 HA-MPER-2 terhadap peptida ELDKWAS.....	64



## DAFTAR TABEL

Tabel 3.1.	Pembuatan larutan, medium, dan <i>buffer</i> .....	75
Tabel 3.2.	Jadwal vaksinasi mencit BALB/c betina .....	39
Tabel 4.1.	Hasil optimasi ELISA beberapa pengenceran serum mencit yang divaksin pcDNA 3.1 HA-MPER-1 terhadap pengenceran berseri peptida ELDKWAS.....	78
Tabel 4.2.	Hasil optimasi ELISA beberapa pengenceran serum mencit yang divaksin pcDNA 3.1 HA-MPER-1 terhadap konsentrasi peptida ELDKWAS 15 µg/mL.....	79
Tabel 4.3.	Hasil optimasi ELISA beberapa pengenceran serum mencit yang divaksin pcDNA 3.1 HA-MPER-1, pcDNA3.1 HA, dan pcDNA3.1 <i>wildtype</i> terhadap konsentrasi peptida ELDKWAS 15 µg/mL.....	80
Tabel 4.4.	Hasil optimasi ELISA penentuan reaktivitas peptida terhadap beberapa kelompok perlakuan dengan atau tanpa serum mencit sebelum diimunisasi vaksin pcDNA3.1 HA-MPER-1 dengan serum sesudah divaksinasi <i>booster</i> ke-2 dengan menggunakan konsentrasi serum 1/25 pada konsentrasi peptida ELDKWAS 15µg/mL .....	81
Tabel 4.5.	Hasil optimasi ELISA antara perlakuan antara <i>blocking buffer</i> 1% gelatin dengan <i>blocking buffer</i> 2%.....	81
Tabel 4.6.	Hasil optimasi ELISA antara perlakuan dengan <i>dilution buffer</i> 0,1%. 1%,1,5% dan 2% .....	82

## DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. Pembuatan larutan, medium, dan <i>buffer</i> .....	75
Lampiran 2. Optimasi ELISA pada beberapa pengenceran serum mencit yang divaksin pcDNA 3.1 HA-MPER-1 terhadap pengenceran berseri peptida ELDKWAS.....	77
Lampiran 3. Hasil kasar uji optimasi ELISA beberapa pengenceran serum mencit yang divaksin pcDNA 3.1 HA-MPER-1 terhadap konsentrasi peptida ELDKWAS 15 µg/mL.....	79
Lampiran 4. Hasil kasar uji optimasi ELISA beberapa pengenceran serum mencit yang divaksin pcDNA 3.1 HA-MPER-1, pcDNA3.1 HA, dan pcDNA3.1 <i>wildtype</i> terhadap konsentrasi peptida ELDKWAS 15 µg/mL.....	80
Lampiran 5. Hasil optimasi ELISA dengan kontrol negatif.....	81
Lampiran 6. Hasil Optimasi ELISA pada <i>blocking buffer</i> dan <i>dilution buffer</i> .....	81
Lampiran 7. Peta ELISA pada uji ELISA terhadap semua kelompok mencit yang diimunisasi vaksin pcDNA3.1 <i>wildtype</i> , pcDNA3.1 HA, pcDNA3.1 HA-MPER-1 dan pcDNA3.1 HA-MPER-2.....	83
Lampiran 8. Hasil kasar uji ELISA serum mencit divaksinasi pcDNA3.1 <i>wildtype</i> terhadap peptida ELDKWAS 15 µg/ml.....	84
Lampiran 9 Hasil kasar uji ELISA serum mencit divaksinasi pcDNA 3.1 HA terhadap peptida ELDKWAS 15.....	85
Lampiran 10. Hasil kasar uji ELISA serum mencit divaksinasi pcDNA3.1 HA-MPER-1 terhadap peptida ELDKWAS 15 µg/mL.....	86
Lampiran 11. Hasil kasar uji ELISA serum mencit divaksinasi pcDNA3.1 HA-MPER-2 terhadap peptida ELDKWAS 15 µg/mL.....	87
Lampiran 12. Uji statistik dengan SPSS 19 pada berbagai kelompok kontrol dan uji pada serum I mencit (sebelum diimunisasi vaksin DNA).....	88
Lampiran 13. Uji statistik dengan SPSS 19 pada berbagai kelompok kontrol dan uji pada serum II mencit (serum diambil dua minggu setelah diimunisasi vaksin DNA).....	90
Lampiran 14. Uji statistik dengan SPSS 19 pada berbagai kelompok kontrol dan uji pada serum III mencit (serum diambil dua minggu setelah diimunisasi vaksin DNA yang kedua).....	92
Lampiran 15. Uji statistik dengan SPSS 19 pada berbagai kelompok kontrol dan uji pada serum IV mencit (serum diambil dua minggu setelah diimunisasi vaksin DNA yang ketiga).....	94
Lampiran 16. Sertifikat analisis peptida ELDKWAS.....	98
Lampiran 17. Surat Keterangan Mencit BALB/c Betina.....	101



# BAB 1

## PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang

*Human Immunodeficiency Virus* (HIV) merupakan salah satu masalah utama didunia. Virus ini menyerang sistem kekebalan tubuh sehingga penderita sangat mudah terserang oleh mikroorganisme dan infeksi oportunistik. Virus ini termasuk dalam famili Retroviridae yang dapat menyebabkan penyakit *Acquired Immunodeficiency Syndrome* (AIDS). HIV dapat menginfeksi sel CD4+ T, makrofag dan jenis sel lain. (Baratawidjaja dan Rengganis, 2009).

Berdasarkan laporan dari Kementerian Kesehatan Republik Indonesia (2011), jumlah kasus baru HIV dari tahun 2008 sampai 2011 mengalami fluktuatif. Pada tahun 2008, tercatat sebanyak 10.362 kasus HIV dan 4.969 kasus AIDS. Pada tahun 2009, tercatat sebanyak 9.793 kasus HIV dan 3.863 kasus HIV. Tahun 2010, tercatat sebanyak 21.591 kasus HIV dan 4.917 kasus AIDS dan pada tahun 2011, tercatat sebanyak 15.589 kasus HIV dan 1.805 kasus AIDS. Sedangkan proporsi kumulatif kasus AIDS pada tahun 2011 lebih tinggi pada laki-laki yaitu sebesar 62% dan pada perempuan yaitu sebesar 34%,

HIV terdiri dari dua jenis. HIV-1 lebih mudah menular dan merupakan sumber dari kebanyakan infeksi HIV di seluruh dunia, sedangkan HIV-2 masih terisolasi di Afrika Barat. (Campbell, Reece and Mitchell, 2004). Virus HIV-1 dibedakan kedalam tiga group, yaitu grup M (*Main*) yang merupakan kelompok virus penyebab pandemik HIV-1 yang paling umum ditemukan, grup O (Outlier) di Afrika Barat dan Eropa, dan Grup N (Non-M/Non-O) di Afrika (Korber *dkk*, 2001). Virus HIV-1 grup M dapat dibagi lagi kedalam 10 sub tipe, yaitu sub tipe A sampai K. Masing-masing sub tipe dapat dibedakan lagi ke dalam sub-sub tipe yang ditandai dengan notasi angka 1—10. Sub tipe yang paling dominan ditemukan adalah sub tipe B yang terdapat di beberapa negara antara lain Amerika Utara, Amerika Latin, Eropa, Jepang, dan Australia (WHO, 2011). Sub tipe-sub tipe HIV-1 dapat berekombinasi membentuk *Circulating Recombinant Form* (CRF) yang dikategorikan kedalam sub tipe E. CRF yang ada di

dunia terdapat sekitar 11 bentuk. Salah satu diantaranya adalah CRF01\_AE, yang umumnya menginfeksi wilayah asia (Korber *dkk*, 2001). Populasi subtype HIV-1 yang mendominasi di Jakarta adalah CRF01\_AE dengan presentasi 96,2% (dari 208 orang). (Sahbandar IN *dkk*, 2009)

Berdasarkan data epidemi yang telah dipaparkan, diperlukan upaya penanggulangan yang lebih nyata dan efektif sehingga berdampak cukup besar dalam mencegah kejadian HIV baru serta mencegah masa inkubasi HIV menjadi AIDS. Salah satu penanggulangan HIV/AIDS yaitu dengan menggunakan antiretroviral. Antiretroviral dapat digunakan untuk menurunkan resiko penularan HIV. Uji klinis *HIV Prevention Trials Network* (HPTN) membuktikan bahwa pemberian obat lebih awal kepada orang yang tertular HIV akan mengurangi risiko penularan virus tersebut kepada pasangan mereka yang sehat hingga 96 persen. (Cohen *dkk*, 2011). Namun, penggunaan antiretroviral yang semakin meluas dengan pengawasan yang tidak selalu dapat dilakukan berpotensi untuk menimbulkan resistensi antiretroviral. (Komisi Penanggulangan AIDS, 2007)

Vaksin merupakan salah satu alternatif lain untuk menekan jumlah kasus HIV baru dan jumlah kasus AIDS. Menurut Plotkin (2008), vaksin lebih efektif dalam melawan patogen dan infeksi alami yang dapat memicu respons imun seluler (sel T) dan humoral (sel B). Penggunaan vaksin ini ditujukan untuk melindungi seseorang untuk melawan infeksi HIV dari berbagai rute transmisi. Selain itu, penggunaan vaksin HIV bertujuan untuk melindungi seseorang terhadap perkembangbiakan virus HIV menjadi penyakit AIDS serta mengurangi transmisi HIV. (Sahni and Nagendra, 2004).

Para peneliti mencoba mengembangkan vaksin untuk mengeradikasi virus dalam tubuh atau dapat mencegah infeksi virus. Tetapi, hal ini masih menghadapi beberapa hambatan. Hambatan hambatan tersebut diantaranya adanya variasi genetik virus yang tinggi, belum diketahui respons imun yang berperan dalam sistem perlindungan, kurangnya hewan coba yang peka untuk pengujian vaksin serta kesulitan dalam menghasilkan antibodi netralisasi spektrum luas. (Girard M, 2006).

Penelitian vaksin HIV di dunia sudah dalam tahap penelitian uji klinis. (Sahni and Nagendra, 2004). Namun, Penelitian tentang vaksin HIV yang telah

lama dilakukan belum menghasilkan vaksin yang efektif. Uji klinis yang baru-baru ini dilakukan, yaitu dengan menggunakan vaksin dengan dasar subunit selubung protein HIV, belum dapat menghasilkan antibodi penetral. Hal ini dianggap gagal menunjukkan perlindungan dalam melawan infeksi HIV (Ling *dkk*, 2011). Menurut Burton (1997), pembentukan antibodi penetral secara luas pada HIV-1 merupakan sasaran utama dari penelitian vaksin. (Zwick *dkk*, 2001).

Penggunaan vaksin DNA merupakan usaha untuk menghasilkan respons imun. Vaksin DNA didefinisikan sebagai plasmid yang mengandung gen viral, parasit, atau bakteri yang dapat diekspresikan ke dalam sel mamalia. Protein yang disintesis dari DNA dalam sel somatik dapat menghasilkan peptida. Peptida akan bersama-sama sistem imun mengendalikan komponen sistem imun. (Donnelly, Waheren Liu, 2005). Vaksin DNA dianggap efektif dan aman karena vaksin ini tidak menyebabkan efek samping yang bermakna. Berdasarkan penelitian Wolff tahun 1992, Vaksin jenis ini terbukti tidak menyebabkan DNA virus terintegrasi ke dalam DNA manusia.

Beberapa Epitop, bagian paling luar dari virus yang dikenali oleh antibodi sel inang dan bersifat menetralkan, telah diidentifikasi dalam selubung protein HIV. Sekuens DNA penyandi protein glikoprotein (gp) 41 lebih lestari dibandingkan sekuens DNA penyandi protein gp120. Gp41 memiliki satu daerah yang terkarakterisasi dengan baik yaitu *Membran-Proximal Ectodomain Region* (MPER). MPER-gp41 telah menjadi perhatian yang besar dan diakui menjadi target yang menjanjikan sehingga dapat digunakan untuk menginduksi antibodi netralisasi spektrum luas. Namun, MPER merupakan imunogenik lemah (Ji Wang, 2011). Selain itu, struktur epitop netralisasi pada MPER-gp41 sulit untuk diakses oleh sistem imun karena tertutup oleh gp-120 (Muster *dkk*, 1993). Oleh karena itu, pada penelitian sebelumnya dikembangkan beberapa modifikasi untuk memperbaiki paparan epitop netralisasi HIV-1 MPER. Salah satu modifikasi region MPER yaitu dengan menggunakan protein *chimera* sebagai antigen. Protein yang digunakan pada penelitian sebelumnya yaitu protein *chimera* hemagglutinin dari influenza A. (Andreas, belum terpublikasi)

Untuk meningkatkan kemandirian bangsa Indonesia dalam pengendalian infeksi HIV-AIDS, *Institute of Human Virus and Cancer Biology of University*

**Universitas Indonesia**

*Indonesia* (IHVCB-UI) berupaya mengembangkan dan menganalisis respons antibodi vaksin DNA dari bagian selubung virus HIV, yaitu MPER gp41, dan virus Influenza H5N1, HA, yang disisipkan pada vektor pcDNA3.1. Penggunaan HA ini didasari karena HA bersifat imunogen kuat yang dapat menginduksi badai sitokin proinflamasi. Selain itu, vaksin dari selubung virus influenza dapat memicu antibodi netralisasi yang dapat dideteksi pada serum individu yang divaksinasi. (Hadestam., *dkk.* 2008). Vaksin yang telah dikonstruksi oleh peneliti sebelumnya, memiliki sisipan pada dua situs antigenik. Namun, pada penelitian kali ini yang dianalisis respons antibodinya yaitu sisipan pada situs antigenik 1, sedangkan untuk situs antigenik 2 digunakan hanya sebagai pembanding. Sisipan pada situs antigenik 1 diharapkan dapat meningkatkan respons imun karena adanya induksi sitokin proinflamasi. Sisipan epitop ELDKWAS pada situs antigenik diharapkan dapat menginduksi respons imun. Respons yang diharapkan dapat menginduksi sistem imun humoral dan selular yang mampu memberikan daya proteksi terhadap HIV-1 wilayah MPER. (Andreas, Belum terpublikasi)

Penelitian ini merupakan suatu terobosan baru dalam penanggulangan HIV/AIDS di Indonesia. Walaupun masih tahap uji pada hewan coba, perkembangan vaksin HIV di Indonesia diharapkan menjadi alternatif lain untuk menekan jumlah kasus HIV/AIDS di Indonesia.

## **1.2 Tujuan Penelitian**

### **1.2.1 Tujuan Umum**

Tujuan umum dari penelitian ini adalah untuk menilai respons spesifik *Membran-Proximal External Region* (MPER) gp41 HIV-1 pada mencit BALB/c yang diimunisasi vaksin DNA HA-MPER-1.

### **1.2.2 Tujuan Khusus**

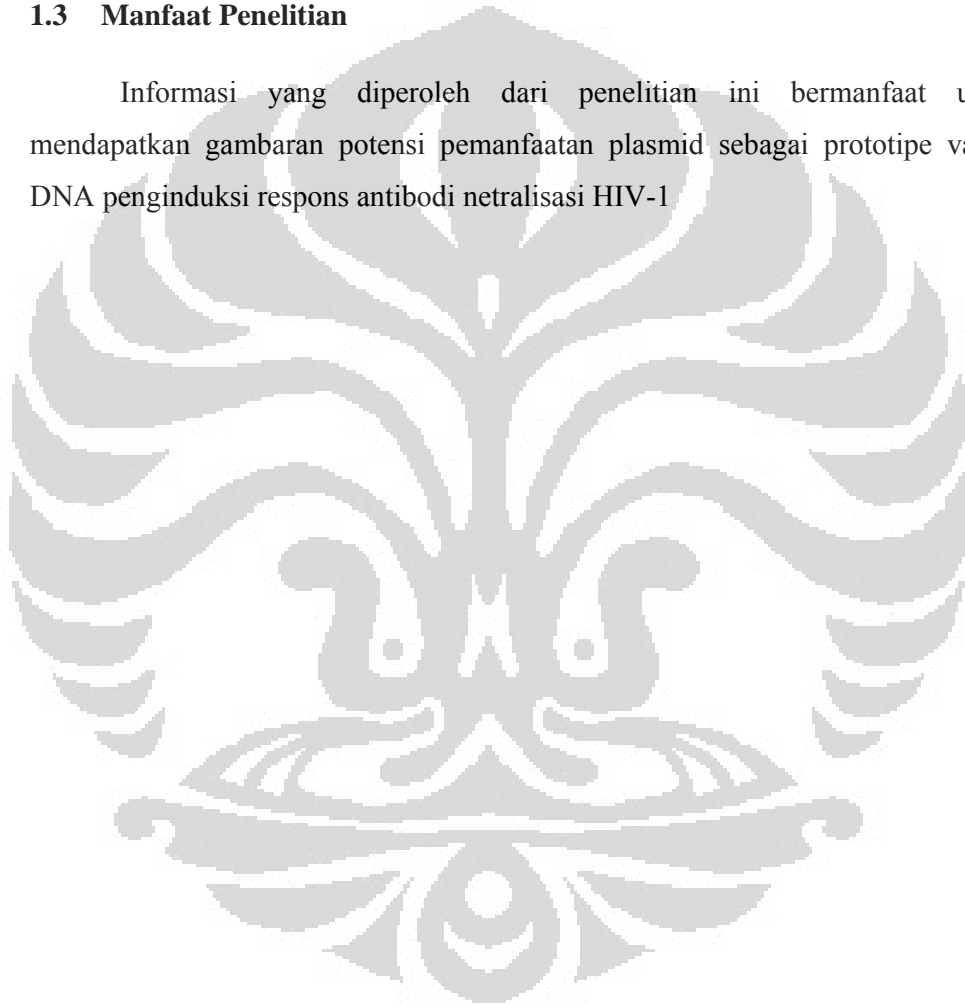
Tujuan khusus dari penelitian ini antara lain :

- a. Untuk mendapatkan preparasi plasmid vaksin pcDNA3.1 HA-MPER-1 dan plasmid vaksin pcDNA3.1 HA dalam bentuk murni

- b. Untuk mendapatkan serum mencit BALB/c yang diimunisasi dengan vaksin pcDNA3.1 HA-MPER-1 dan vaksin pcDNA3.1 HA
- c. Untuk mendapatkan perbandingan respons antibodi spesifik MPER-gp41 pada populasi mencit BALB/c yang diimunisasi dengan vaksin pcDNA3.1 *wildtype*, pcDNA3.1 HA- MPER-1 dan vaksin pcDNA3.1 HA

### 1.3 Manfaat Penelitian

Informasi yang diperoleh dari penelitian ini bermanfaat untuk mendapatkan gambaran potensi pemanfaatan plasmid sebagai prototipe vaksin DNA penginduksi respons antibodi netralisasi HIV-1



## **BAB 2**

### **TINJAUAN PUSTAKA**

#### **2.1 *Human Immunodeficiency Virus (HIV)***

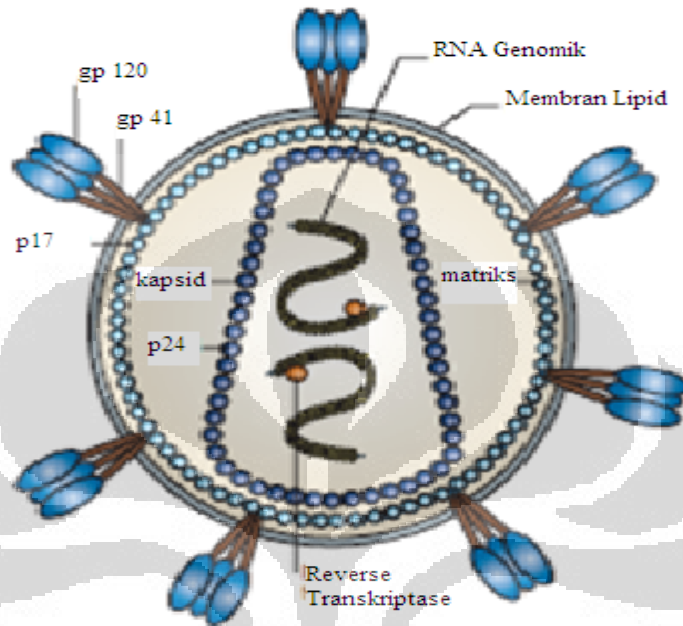
*Human Immunodeficiency Virus (HIV)* merupakan virus penyebab *Acquired Immunodeficiency Syndrome (AIDS)*. Virus ini termasuk ke dalam famili Retroviridae subfamilia Orthoretrovirinae serta genus lentivirus. Retrovirus merupakan virus yang mengandung RNA sebagai material genetik. Lentivirus memiliki periode waktu yang lama dari menginisiasi sel inang sampai menimbulkan gejala yang serius. Hal ini yang menyebabkan pasien HIV tidak sadar bahwa mereka telah terinfeksi HIV dan dapat menyebarkan virus ini ke orang lain (Departement of Health and Human Services National Institute of Health, 2009). Infeksi HIV terjadi melalui tiga jalur transmisi utama, yaitu transmisi melalui mukosa genital, transmisi langsung ke peredaran darah melalui jarum suntik yang telah terinfeksi virus HIV, dan transmisi vertikal dari ibu ke janin. (Sudoyo, Setyohadi, Alwi, Simadibrata, Setiati, 2006)

##### **2.1.1 Struktur dan Genom HIV**

HIV merupakan suatu virus RNA bentuk sferis dengan diameter 1000 angstrom. Strukturnya terdiri dari lapisan luar atau selubung. (Gambar 2.1) Selubung merupakan lapisan luar virus terdiri dari dua lapisan molekul lemak yang disebut membran lipid. Selubung terdiri dari sebuah penutup yang terbuat dari tiga atau empat molekul yang disebut gp 120, dan sebuah batang yang terdiri tiga sampai empat gp41. Glikoprotein 120 melekat pada glikoprotein gp41. (Baratawidjaja dan Rengganis, 2009)

Pada bagian dalam selubung, terdapat lapisan kedua yang terdiri dari protein p17. P17 merupakan matriks protein HIV. Sedangkan, p24 merupakan bahan pembentuk kapsid. Kapsid mengelilingi dua untai tunggal RNA identik yang merupakan genom virus yang berhubungan dengan p17 dan p24 berupa inti polipeptida. (Baratawidjaja dan Rengganis, 2009). Dua untai rantai masing-masing memiliki salinan dari sembilan gen virus. Selain RNA, di dalam inti juga terdapat tiga enzim yang diperlukan untuk replikasi HIV yang

disebut reverse transcriptase, integrase dan protease (Sudoyo, Setyohadi, Alwi, Simadibrata, Setiati, 2006 & Departement of Health and Human Services National Institute of Health, 2009).



[Sumber : Hadestam., et al. 2008, telah diolah kembali]

**Gambar 2.1.** Struktur HIV

Genom HIV adalah RNA yang terdiri dari dua subunit identik dengan panjang sekitar 9200 pasang basa. HIV memiliki tiga gen utama yaitu gag, pol, dan env, selain tiga gen utama, HIV memiliki beberapa gen tambahan yaitu tat, rev, vif, vpr, vpu, nef dan LTR. (Radji,M , 2010).

Gen gag merupakan gen yang menyandi protein struktur inti yang terdiri dari p24, p17, p9 dan p7. Gen pol merupakan gen yang menyandi enzim reverse transcriptase, endonuklease, dan protease yang diperlukan untuk replikasi virus. Gen env yaitu gen yang menyandi pembentukan glikoprotein gp120 dan gp41 yang diperlukan untuk menginfeksi sel. (Radji,M , 2010) Gen LTR (*Long Term Repeat*) yang terdapat pada setiap ujung gen berfungsi sebagai gen yang mengatur integrasi virus dan gen penjamu, ekspresi gen dan replikasi virus. gen tambahan lainnya yaitu tat, rev, vif, vpr, vpu, dan nef, produknya mengatur reproduksi virus dengan berbagai cara (Kresno, 2001).

### 2.1.2 Siklus Virus HIV

Masa inkubasi HIV berkisar antara 6 minggu sampai 6 tahun atau lebih, dengan waktu rata-rata sekitar 28 bulan. Diperkirakan masa inkubasi AIDS pada penderita yang terinfeksi oleh HIV melalui transfusi darah rata-rata 5 tahun. (Radji, 2010).

Siklus virus HIV terbagi menjadi beberapa tahap (Gambar 2.2). (Freed, 2006) Tahap pertama yaitu fusi HIV ke dalam sel inang. Infeksi dimulai ketika partikel HIV yang terdapat pada permukaan sel bertemu dengan molekul CD4+ (sel T-penolong). Satu atau lebih gp120 akan melekat pada CD4+. Partikel HIV yang berikatan dengan molekul CD4 kemudian masuk ke dalam sel hospes melalui fusi antara membran virus dengan membran sel hospes dengan bantuan gp41. Kemudian melepas genomnya ke dalam sel.

Tahap ke dua yaitu setelah virion HIV masuk ke dalam sel, maka enzim yang terdapat dalam nukleoprotein menjadi aktif dan memulai siklus reproduksi virus. Nukleoprotein inti virus menjadi rusak. Kemudian, di dalam sitoplasma sel, genom RNA virus akan ditranskripsi menjadi DNA oleh enzim reverse transkriptase.

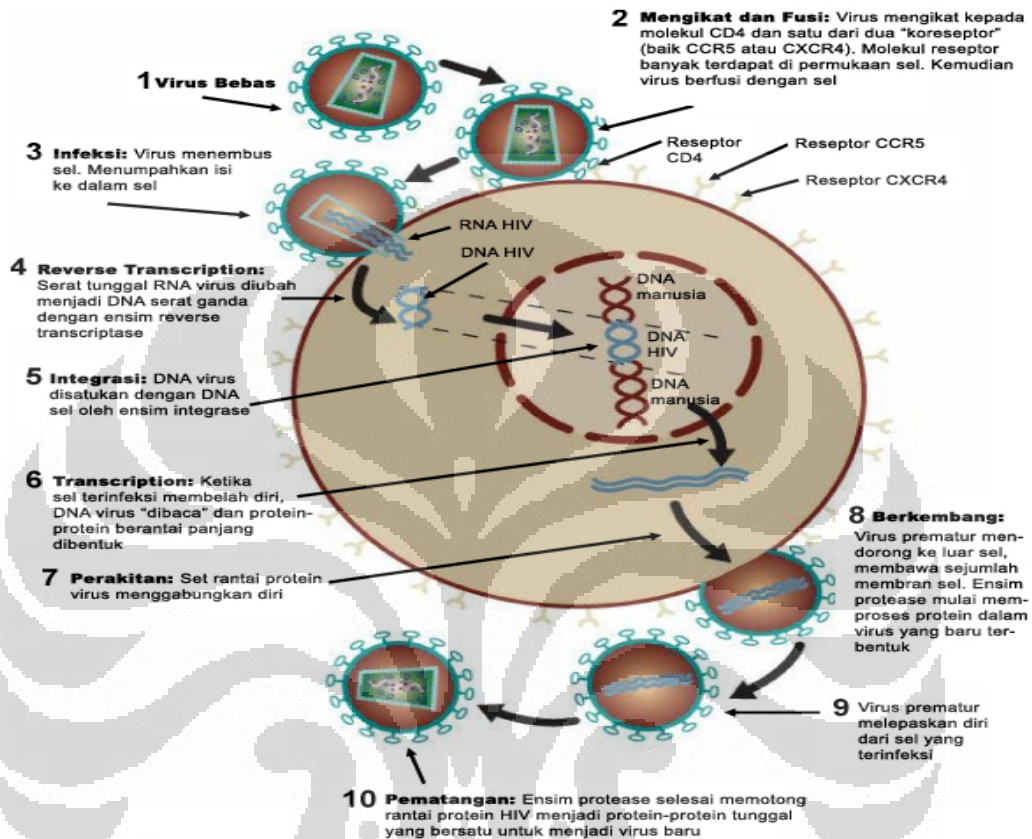
Tahap ke tiga yaitu DNA HIV yang baru dibuat akan masuk ke inti sel dan disisipkan ke dalam DNA sel inang dengan bantuan enzim integrase. DNA HIV yang sudah bergabung dengan DNA sel inang tersebut disebut provirus. Provirus mampu bertahan dalam bentuk inaktif selama beberapa bulan atau beberapa tahun tanpa memproduksi virion baru.

Tahap ke empat yaitu aktivasi provirus diawali dengan transkripsi gen struktural menjadi mRNA, menggunakan enzim sel inang sendiri. Setelah mRNA HIV diproses dalam inti sel, mRNA ini dibawa kembali ke sitoplasma dan digunakan sebagai template untuk memproduksi protein HIV baru dan enzim. Proses ini disebut translasi.

Tahap ke lima yaitu RNA virus, protein virus baru dan enzim HIV akan berpindah ke permukaan sel dan membentuk partikel-partikel virus baru. Virus yang belum matang ini kemudian akan membentuk membran dan menggunakan membran plasma sel hospes yang telah dimodifikasi dengan glikoprotein virus, membentuk selubung virus yang kemudian melepaskan diri dari sel inang. Enzim



protease memotong rantai panjang protein menjadi protein individual yang lebih kecil, yang digunakan untuk membentuk inti virus. Terakhir, partikel HIV baru dapat menginfeksi sel lain dan memulai proses replikasi lagi.



[Sumber : ODHA Indonesia, 2007 ]

**Gambar 2.2.** Siklus virus HIV

### 2.1.3 Respons Imun pada penderita HIV-1

Virion HIV dapat masuk ke dalam tubuh inang melalui permukaan mukosa seperti pada kontak seksual (melalui rektal atau mukosa serviks) atau melalui darah (contohnya transfuse darah HIV positif, penggunaan jarum terkontaminasi HIV). Dari lapisan mukosa, virus dibawa ke kelenjar limfe oleh sel dendritik. Didalam sel dendritik virus tumbuh dan menyebar dari sel ke sel tanpa merusak sel tersebut. Virus memperbanyak diri melalui makrofag yang ada di darah, sumsum tulang, organ limfoid, dan kulit. HIV menginfeksi dan merusak sel yang dibutuhkan dalam pertahanan tubuh, khususnya sel T penolong atau CD4, juga monosit dan limfosit B. (Talaro, 2008 & Kumar V, 2005).

Pada tahap awal virus dapat menyebabkan infeksi litik, dan selanjutnya sel virus memasuki periode laten di nukleus sel inang dan mengintegrasikan DNA virus dengan DNA sel inang. Keadaan laten ini berlangsung lama dan tidak menyebabkan gejala klinik. (Talaro, 2008).

Respons imun yang terjadi segera setelah terpajan HIV yaitu terbentuknya antibodi-antibodi spesifik terhadap berbagai protein virus. Antibodi terhadap HIV dapat muncul dalam 1 bulan setelah infeksi awal dan pada sebagian besar orang yang terinfeksi HIV dalam 6 bulan setelah pajanan. Namun, antibodi HIV tidak menetralkan HIV atau menimbulkan perlindungan terhadap infeksi lebih lanjut. (Price S.A dan Lorraine M.W, 2006)

Respons imun yang berperan dalam pembentukan antibodi spesifik terhadap protein virus yaitu Sel-sel B. Sel-sel B merupakan sel yang berfungsi menghasilkan immunoglobulin. Immunoglobulin G merupakan immunoglobulin yang paling sering ditemukan di dalam serum dan sering digunakan dalam uji HIV. Produksi immunoglobulin diatur oleh limfosit T CD4+. Limfosit T CD4+ diaktifkan oleh sel penyaji antigen atau sering disebut juga *antigen presenting cellular* (APC) untuk menghasilkan berbagai sitokin seperti interleukin-2 (IL-2), yang membantu merangsang sel B untuk membelah dan berdiferensiasi menjadi sel plasma. Sel-sel plasma ini kemudian menghasilkan immunoglobulin yang spesifik untuk antigen yang merangsangnya. Sitokin IL-2 hanyalah salah satu dari banyak sitokin yang mempengaruhi respons imun baik humoral maupun selular. (Price S.A dan Lorraine M.W, 2006)

Respons imun lain yang turut berperan dalam infeksi HIV yaitu sitotoksik sel CD8. Peran sitotoksik sel CD8 dalam infeksi HIV adalah dalam mengikat sel yang terinfeksi oleh virus dan mengeluarkan perforin, yang menyebabkan kematian sel. Aktivitas sitotoksik sel CD8 sangat kuat pada awal infeksi HIV dan menurun seiring dengan berkembangnya penyakit.

## 2.2 Imunogen dan Antigen

Imunogen adalah bahan yang menginduksi respons imun. Respons imun ditandai dengan induksi sel B untuk memproduksi immunoglobulin dan aktivasi sel T yang melepas sitokin (Baratawidjaja dan Rengganis, 2009). Imunogenesitas adalah

kemampuan untuk menginduksi respons imun humoral atau selular. (Baratawidjaja dan Rengganis, 2009). Antigen adalah bahan yang berinteraksi dengan produk respons imun yang dirangsang oleh imunogen spesifik seperti antibodi. (Baratawidjaja dan Rengganis, 2009). Antigenesitas adalah kemampuan suatu antigen untuk menginduksi respons imun yang dapat bereaksi dengan reseptor antigen tersebut yang diproduksi sel B (antibodi) dan reseptor antigen pada permukaan sel T. (Baratawidjaja dan Rengganis, 2009).

Imunogenesitas dan antigenesitas mempunyai hubungan satu dengan lain tetapi berbeda dalam sifat imunologinya. Semua molekul dengan sifat imunogenesitas juga memiliki sifat antigenesitas, namun tidak demikian sebaliknya. (Baratawidjaja dan Rengganis, 2009). Ini berarti bahwa semua imunogen adalah antigen, tetapi tidak semua antigen merupakan imunogen. (Kresno, 2001)

Semua molekul biologik, termasuk karbohidrat, lipid, hormon, protein dan asam nukleat dapat bertindak sebagai antigen, tetapi hanya makromolekul yang bersifat imunogenik dan mampu merangsang aktivitas limfosit yang diperlukan untuk mengawali respons imun. Imunogen yang paling poten umumnya merupakan makromolekul protein, polisakarida, polipeptida atau dapat juga berupa polimersintetik misalnya polivinilpirolidon (PVP). (Kresno, 2001)

Menurut Kresno (2001), faktor penting yang menentukan imunogenitas yaitu sifat asing imunogen, molekul substansi, kompleksitas susunan molekul, cara masuk substansi ke dalam tubuh, besarnya dosis yang diperlukan dan faktor genetik individu. Sifat asing imunogen dapat terjadi bila ada perubahan konfigurasi atau komposisi substansi yang semula bukan merupakan substansi asing. Molekul substansi harus berukuran cukup besar, walaupun belum diketahui batas ukuran molekul yang menentukan imunogenitas. Molekul-molekul kecil seperti asam amino atau monosakarida umumnya kurang imunogenik. Imunogenik yang paling poten adalah makromolekul protein dengan berat molekul lebih besar dari 100.000. kompleksitas susunan molekul mempengaruhi imunogenitas, makin kompleks susunan molekulnya makin tinggi imunogenesitasnya.

Cara masuk substansi ke dalam tubuh dan besarnya dosis juga menentukan respons imun yang ditimbulkan. Antigen yang dimasukkan secara intravena kurang imunogenik dibandingkan dengan antigen yang dimasukkan secara subkutan. Dosis

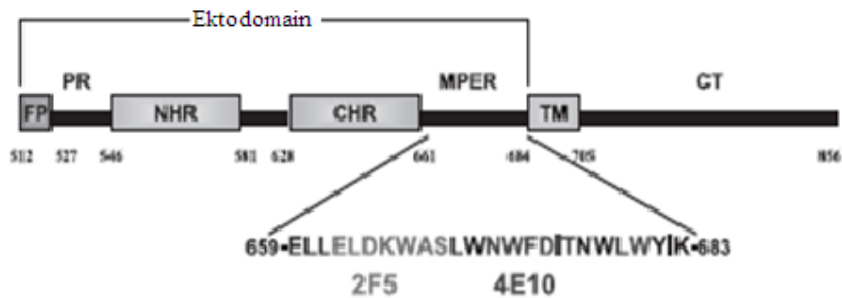
yang diberikan harus tepat, karena bukan tidak mungkin dosis yang diberikan bahkan tidak mampu merangsang respons imun. Faktor genetik individu yang terpapar pada antigen juga menentukan respons imun. Ada kemungkinan dua orang yang berbeda sifat genetiknya menunjukkan respons imun yang berbeda terhadap antigen yang sama. (Kresno, 2001)

Secara umum antigen digolongkan dalam antigen eksogen yaitu antigen yang berasal dari luar tubuh seseorang, misalnya berbagai jenis bakteri, virus, obat, dan antigen endogen yang terdapat didalam tubuh. Antigen endogen termasuk antigen *xenogeneic* atau heterolog yang terdapat dalam spesies yang berlainan, antigen autolog atau idiotipik yang merupakan komponen tubuh sendiri, dan antigen *allogeneic* atau homolog yang membedakan satu individu dari individu yang lain dalam spesies yang sama. Contoh determinan antigen homolog adalah antigen yang terdapat pada eritrosit, leukosit, trombosit, protein serum dan *Major Histocompatibility Complex* (MHC).

Kompleksitas kimia suatu molekul sangat berperan pada imunogenesitas. Keanekaragaman kimia memungkinkan adanya berbagai epitop. Epitop yaitu bagian dari antigen yang dapat membuat kontak fisik dengan reseptor antibodi, menginduksi pembentukan antibodi yang dapat diikat dengan spesifik oleh bagian dari antibodi atau oleh reseptor antibodi.

### 2.2.1 *Membrane-Proximal External Region* (MPER) gp41

Selubung gp41 memegang peranan penting sebagai tempat masuk virus ke dalam sel. Selubung gp41 terdiri dari 345 asam amino (aa) dengan berat molekul 41 kDa. Selubung ini lebih mempunyai beberapa daerah yang berbeda yang masing-masing memiliki fungsi yang unik dan mempunyai peranan penting daripada gp120. (Montero, 2008). Selubung protein gp41 dibagi menjadi tiga domain utama (Gabuzda *dkk*, 1992). Tiga domain tersebut yaitu ektodomain, daerah transmembran (TM), dan ekor sitoplasmik(CT).(Gambar 2.3)



[Sumber : Montero,2008]

**Gambar 2.3.** Struktur gp41

Ektodomain berisi beberapa faktor fungsional yang terlibat dalam penggabungan sel virus dan membran sel. Faktor fungsional tersebut dibagi menjadi enam daerah. Salah satu dari enam daerah tersebut dikenal sebagai daerah yang kaya Trp yang disebut juga MPER. (Montero,2008). MPER merupakan bagian dari ektodomain gp41 yang terdiri dari 24 C-terminal asam amino terakhir. MPER bersifat lestari (Zwick, 2004).

MPER memiliki peran dalam membran fusi virus dan sel. Penghapusan dari 17 asam amino dari MPER tersebut akan menghilangkan kemampuan selubung untuk memediasi kedua sel, sel transmisi dan virus masuk. Hal ini menunjukkan bahwa MPER sangat penting untuk aktivitas fusi dan untuk penggabungan selubung ke dalam virus. (Salzwedel *dkk*, 1998). Peran MPER dalam proses fusi selanjutnya didukung oleh kemampuan dari tiga jenis antibodi monoklonal penetral yaitu 2F5, 4E10 dan Z13 untuk mengenali daerah epitop. (Zwick, 2001) Sehingga tiga antibodi yang dihasilkan terhadap daerah MPER dapat menetralkan virus dengan menghambat proses fusi, dengan cara mengganggu langkah yang diperlukan untuk virus masuk. (Montero,2008).

Struktur 2F5, ELDKWA, memiliki inti asam amino DKW dengan asam amino disekitarnya sebagai penyokong struktur DKW tersebut (Zwick *dkk*, 2005). MPER kurang imunogenik karena strukturnya tertutup oleh gp 120 pada keadaan awal. Tetapi akan berubah menjadi terpapar ketika adanya interaksi antara gp 120 dengan CD4. (Peachman, 2010). Oleh karena itu, modifikasi struktur MPER pada antigen lain menjanjikan untuk meningkatkan paparan epitop netralisasi. Muster *dkk* menyisipkan epitop 2F5 pada situs antigenik HA. Antibodi yang dihasilkan

dari imunisasi pada hewan coba dapat menetralkan isolasi HIV-1 dari beberapa galur (Muster dkk, 1994)

### 2.2.2 Hemagglutinin (HA)

Struktur virus Influenza memiliki tiga viral protein pada bagian terluar yang tidak terlindung. Tiga viral protein tersebut yaitu Neuramidase (NA), M2, dan Hemagglutinin (HA). HA memiliki bentuk trimer. Protein matriks berada pada bagian dalam membran virus. Genom virus terdiri dari 8 bagian galur negatif RNA dan dibungkus ke dalam suatu partikel sebagai ribonukleoprotein dalam kompleks dengan nukleokapsid protein (NP) dan polimerase virus yaitu PA, PB1 dan PB2. (Hadestam dkk. 2008)

HA merupakan bagian dari struktur virus Influenza berbentuk trimer yang memiliki kemiripan dengan selubung HIV-1. (Gambar 2.4) HA memiliki berat molekul 76000 DA. Ketika pembelahan proteolitik, HA diproses menjadi HA1 dan HA2. HA mengalami trimerisasi dan ditransportasikan melalui badan golgi ke permukaan sel. HA melakukan pembelahan pada saat partikel virus dilepaskan menghasilkan HA 1 yang ekuivalen dengan gp120 pada HIV dan HA2 yang ekuivalen dengan gp41 pada HIV-1. HA1 merupakan subunit virus Influenza yang memperantarai ikatan reseptor, *sialic acid*. (Hadestam dkk, 2008)



[Sumber : Hadestam., et al. 2008]

**Gambar 2.4.** Struktur virus Influenza

Virus influenza masuk melalui kompartemen endosomal ketika berikatan dengan reseptor. Sekali dalam lingkungan dengan pH yang rendah, HA menjalani

perubahan konformasi yang tidak dapat berubah dan menghasilkan paparan *N-terminal fusion* yang dilokasikan pada HA2. kebanyakan antibodi penetral mengganggu kemampuan virus untuk mengikat reseptor dan mendapatkan jalan ke kompartemen pH rendah. (Hadestam *dkk*, 2008)

HA merupakan antigen eksternal yang diekspresikan dipermukaan virus. Hanya antibodi terhadap antigen eksternal yang dapat menetralisasi virus dan mencegah infeksi. Tidak semua antigen eksternal menginduksi respons protektif. Antibodi terhadap molekul hemagglutinin influenza lebih efektif dalam mencegah infeksi (Baratawidjaja dan Rengganis, 2009). HA juga merupakan salah satu protein yang telah banyak dipelajari selain dalam proses infeksi virus ke sel. HA juga menjadi model untuk mempelajari proses pelipatan protein dan transport protein dalam sel sebagai pengendali kualitas protein, fusi membran, interaksi protein dengan reseptor kompleks dengan antibodi serta bagaimana respons imun terhadap protein asli dihasilkan. (Field B, 2007)

### **2.3 Antibodi**

Respons imun sangat bergantung pada kemampuan sistem imun untuk mengenali molekul asing (antigen) yang terdapat pada patogen potensial dan kemudian membangkitkan reaksi yang tepat untuk menyingkirkan sumber antigen yang bersangkutan. Proses pengenalan antigen dilakukan oleh unsur utama sistem imun, yaitu limfosit, yang kemudian diikuti oleh fase efektor yang melibatkan berbagai sel. (Kresno, 2007). Antibodi dapat membantu sebagai perlawanan pertama dengan mencegah infeksi atau mengurangi inokulum virus. Sedangkan respons selular akan memfasilitasi bersihan HIV yang menginfeksi CD4 T-cell dan mengurangi keganasan penyakit HIV. (Srivastava, Ulmer, Barnett, 2005)

Respons humoral merupakan salah satu dari dua macam respons imun spesifik. Proses respons imun humoral dimulai dari masuknya antigen ke dalam tubuh. Proses ini akan berlanjut dengan interaksi antara sel B dan sel T dengan respons imun lainnya. Sehingga sel plasma akan membentuk antibodi yang spesifik terhadap hanya satu jenis antigen tertentu. Ketika antibodi mengenali antigen yang masuk ke dalam tubuh maka akan terjadi reaksi yang spesifik antara

antigen dan antibodi sehingga terbentuk kompleks antigen-antibodi melalui *antigen binding site*. (Radji, 2010)

Antibodi dikeluarkan ke dalam darah atau limfe, bergantung pada lokasi sel plasma yang aktif. Semua antibodi pada akhirnya memperoleh akses ke darah, tempat mereka dikenal sebagai globulin gamma atau immunoglobulin (Ig). Antibodi merupakan kelompok besar dari glikoprotein yang memiliki fungsi struktural dan fungsional. Secara fungsional antibodi memiliki kemampuan untuk berikatan dengan antigen dan sel tertentu atau protein dari sistem imun. Sedangkan secara struktural antibodi disusun oleh suatu unit karakteristik yang dapat digambarkan sebagai bentuk menyerupai huruf Y. masing-masing unit Y terdiri dari empat polipeptida, dua polipeptida identik tersebut disebut sebagai rantai berat (*heavy chain*) dan dua lainnya sebagai rantai ringan (*light chain*).

Menurut perbedaan dalam aktivitas biologis, antibodi dikelompokkan menjadi lima subkelas. Lima subkelas tersebut yaitu IgM, IgG, IgE, IgA, IgD. IgM berfungsi sebagai reseptor permukaan sel B untuk tempat antigen melekat dan disekresikan dalam tahap-tahap awal respons sel plasma. IgG merupakan immunoglobulin yang paling banyak di dalam darah, dihasilkan dalam jumlah besar ketika tubuh terpajan ulang ke antigen yang sama. Antibodi IgG dan IgM bertanggung jawab bagi sebagian besar respons imun spesifik terhadap bakteri dan beberapa jenis virus. IgE adalah mediator antibodi untuk respons alergi. IgA ditemukan dalam sekresi sistem pencernaan, pernafasan, dan genitouria, serta didalam air susu dan air mata. IgD terdapat dipermukaan sel B, tetapi fungsinya masih belum jelas. (Sherwood, 2001)

#### 2.4 *Escherichia coli* TOP 10

*Escherichia coli* merupakan kelompok bakteri gram negatif yang berbentuk batang, bersifat fakultatif anaerob, serta mempunyai kromosom yang berbentuk sirkular. Bakteri *E.coli* paling banyak digunakan dalam teknologi rekayasa Genetika dan bisa digunakan sebagai sel inang. Salah satu alasan *E.coli* banyak digunakan karena bakteri ini cukup mudah untuk dikulturkan. (Ausubel *dkk*, 1990)

*E.coli* Top 10 terdiri dari 2 jenis yaitu *E.coli* Top 10 dan *E.coli* Top 10F. Galur yang digunakan untuk proses transformasi yaitu *E.coli* Top 10. Jenis galur

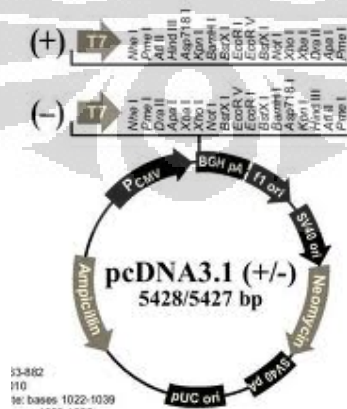


ini mirip dengan *E.coli* DH10B. Keduanya memiliki genotip yang sama. *E.coli* Top 10 digunakan karena cocok digunakan untuk proses transformasi. Selain itu, *E.coli* TOP 10 tersebut tidak memiliki faktor fertilitas sehingga dapat menerima plasmid yang diintroduksi ke dalamnya. (Open WetWare, 2012)

## 2.5. Plasmid pcDNA 3.1 (+)

Beberapa bakteri memiliki sejumlah besar molekul DNA berbentuk lingkaran kecil yang mengandung beberapa ribu pasang basa, minimikrosom ini disebut plasmid. Plasmid adalah molekul DNA bakteri kecil yang berkembang biak secara autonom, yang mengandung gen-gen yang memindahkan daya tahan pada antibiotik-antibiotik khusus. (Watson, Tooze, dan Kurtz, 1988)

Plasmid pcDNA 3.1 (+) merupakan vektor dengan sistem ekspresi mamalia. Plasmid tersebut memiliki promotor CMV (pCMV) sehingga gen sisipan dapat diekspresikan pada sel mamalia. Selain itu, pcDNA 3.1 (+) mengandung *multiple cloning sites* (MCS) sebagai tempat sisipan gen dengan urutan enzim restriksi sebagai berikut: *NheI*, *PmeI*, *AflII*, *Hind III*, *Asp 7181*, *KpnI*, *BamHI*, *BstXI*, *EcoRI*, *EcoRV*, *BstXI*, *NotI*, *XhoI*, *XbaI*, *DraII*, *ApaI*, *PmeI*. Plasmid pcDNA 3.1 (+) juga memiliki gen resisten ampisillin dan neomisin untuk seleksi klon pada tahap transformasi. Vektor ini dapat bereplikasi pada sel bakteri karena memiliki situs replikasi pUC ori dan juga pada sel mamalia secara episomal (diluar kromosom) yang telah terinfeksi secara laten oleh virus SV40 atau yang mengekspresikan SV40 large T-antigen. (Invitrogen, 2010) (Gambar 2.5).



[sumber : invitrogen, 2010]

**Gambar 2.5.** Peta plasmid pcDNA3.1 (+/-)

## 2.6 Vaksin

Vaksin merupakan varian atau derivatif yang tidak merusak dari mikroba patogenik, yang menstimulasi sistem imun untuk membangun pertahanan tubuh yang kuat untuk melawan patogen sesungguhnya. (Campbell, Reece, Mitchell, 2002). Vaksin berperan penting menginduksi memori imunologik pada sel T, Sel B, sel APC.

Vaksin memiliki beberapa jenis berdasarkan proses produksinya antara lain (Girard *dkk*, 2011) :

- a. Vaksin hidup dilemahkan (*live attenuated vaccines*). Vaksin jenis ini memungkinkan memicu respons sitotoksik limfosit T dan sistem imun humoral. (Montgomery *dkk*, 1997). Vaksin ini telah berhasil digunakan untuk melindungi sejumlah penyakit termasuk polio dan campak. Vaksin jenis mutan gen nef pada galur *Virus Simian Immunodeficiency* (SIV) telah menunjukkan perlindungan yang cukup menjanjikan dari infeksi SIV yang menular. Akan tetapi, keamanan merupakan masalah serius dari vaksin ini. Karena vaksin ini memberikan kesempatan galur HIV menjadi berbalik lebih virulen. (Sahni and Nagendra, 2004). Sehingga vaksin HIV ini tidak di uji pada manusia. Vaksin ini dapat memberikan proteksi tetapi virus tetap berada dalam infeksi persisten. Inaktivasi dengan panas atau formalin tidak menjanjikan karena dapat menghilangkan antigenitas envelop virus. Percobaan inaktivasi secara kimia dapat memberikan respons imun yang baik, tetapi pada hewan coba tidak mampu melindungi dari infeksi virus lainnya. (Girard, Osmanov, Kieny, 2006)
- b. Vaksin yang dimatikan (*Killed Vaccine/Inactivated Vaccine*). 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 adjuvant untuk meningkatkan respons imunologik. (Sudoyo, Setyohadi, Alwi, Simadibrata, Setiati, 2006). Vaksin ini tidak menginduksi secara potensial respons sitotoksik limfosit T. (Montgomery *dkk*, 1997).
- c. Vaksin subunit. Vaksin ini terdiri dari unit-unit molekul pembentuk virus vaksin ini terbagi menjadi 3 jenis yaitu molekul asli selubung, Molekul

selubung yang dimodifikasi, dan vaksin basis tat. Jenis vaksin dengan subunit molekul asli selubung, protein subunit vaksin dikembangkan berdasarkan monomer HIV-1 gp160. Antigen ini dihasilkan dalam bentuk larutan dengan menggunakan alum sebagai adjuvant. Vaksin ini terbukti menginduksi antibodi penetral dan dapat melindungi simpanse terhadap galur HIV-1. (Girard *dkk*, 2011)

- d. Vaksin DNA (*Plasmid DNA Vaccines*). Vaksin DNA didefinisikan sebagai plasmid yang mengandung gen viral, parasit, atau bakteri yang dapat diekspresikan ke dalam sel mamalia (Montgomery, 1997). Hasil akhir penelitian pada binatang percobaan menunjukkan bahwa vaksin DNA (virus dan Bakteri) merangsang respons humoral dan selular yang cukup kuat. Sedangkan penelitian klinis pada manusia saat ini sedang dilakukan. (Sudoyo, Setyohadi, Alwi, Simadibrata, Setiati, 2006)

#### 2.6.1 Vaksin DNA

Pada tahun 1990 Wolff *dkk* mencoba menyuntikan plasmid DNA dalam larutan saline (NaCl 0,9%) pada sel otot rangka tikus. Dan hasilnya sangat baik karena awalnya dianggap plasmid tidak akan bisa menembus ke dalam sel secara *invivo* tanpa pembawa (*excipient*). (Montgomery, 1997) Studi yang sama menunjukkan bahwa plasmid yang berada dalam sel tidak bereplikasi dengan genom DNA tikus. (Wolff, 1992). Hal ini menunjukkan bahwa plasmid DNA aman digunakan pada sel mamalia. (Montgomery, 1997).

Vaksin DNA merupakan potongan DNA yang disatukan ke dalam DNA plasmid bakteri. Plasmid yang telah direkayasa sebelumnya secara genetik, mengandung gen virus yang akan disuntikkan ke dalam otot atau kulit.

Struktur dan elemen genetik dari suatu vaksin DNA terdiri dari dua unit utama yaitu unit propagansi plasmid yang berfungsi sebagai pengendali replikasi dan perbanyakan plasmid DNA secara *invitro* dalam sel bakteri dan fragmen DNA yang mengandung gen vaksin yang telah dikloning ke dalam plasmid DNA. (Radji, 2011). Faktor-faktor yang mendasari pembuatan vaksin DNA yaitu desain vektor, pemilihan gen untuk antigen, optimasi ekspresi gen (Montgomery, 1997).

Mekanisme kerja vaksin DNA dalam merangsang sistem imun adalah setelah plasmid DNA disuntikkan ke dalam jaringan maka plasmid DNA akan bereplikasi secara otonom dan memproduksi protein asing atau antigen yang dikode oleh gen vaksin. Antigen ini langsung dapat menstimulasi sel B yang kemudian dapat memproduksi antibodi terhadap antigen atau protein asing yang dikode oleh plasmid DNA. Sel yang mengandung antigen asing tersebut kemudian dapat bersifat sebagai sel penyaji antigen, yang kemudian dapat melalui jalur-jalur tertentu, baik melalui jalur *Major Histo-Compatibility Complex* (MHC) I pada sel CD8+T atau MHC II pada sel CD4+T, sehingga mengalami proses yang berbeda dalam merangsang sistem imunitas tubuh. (Radji, 2011)

Keuntungan vaksin DNA, yaitu Plasmid DNA mudah diproduksi dalam jumlah yang besar secara lebih ekonomis, dalam waktu yang lebih cepat dibandingkan dengan vaksin konvensional, (Montgomery, 1997) DNA sangat stabil, tahan terhadap perubahan suhu sehingga lebih mudah untuk disimpan dan didistribusikan. Sekuen DNA dapat disesuaikan dengan perubahan mikroorganisme patogen, dapat direkayasa dengan gabungan beberapa plasmid DNA yang mempunyai spektrum luas untuk beberapa epitop antigen, vaksin DNA terbukti dapat meningkatkan imunitas tubuh terhadap virus dan bakteri dalam waktu yang sangat lama, dan tidak memerlukan perlakuan khusus terhadap mikroba patogen selama produksi. (Radji, 2011)

Vaksin DNA HIV telah dikembangkan dengan menggunakan antigen HIV dari daerah env dan daerah inti dari virus. Sistem kekebalan tubuh akan mengenali protein HIV dan akan merespons sistem kekebalan tubuh terhadap protein virus yang telah diekspresikan. (Sahni and Nagendra, 2004).

Sifat Ideal vaksin AIDS yaitu kegunaan dalam mencegah transmisi dari rute mukosal dan parenteral, memiliki profil keamanan yang baik, dapat diberikan dalam dosis tunggal, memiliki efek perlindungan jangka panjang bertahun-tahun setelah vaksinasi, harga murah, stabil dalam berbagai kondisi, mudah dari sisi rute administrasi, memiliki kemampuan dalam perlindungan melawan infeksi. (Sahni dan Nagendra, 2004)

## 2.7 Transformasi Plasmid DNA

Transformasi merupakan proses dimana plasmid DNA diperkenalkan ke dalam sel inang bakteri lain. Beberapa galur *E. coli* dapat ditransformasikan dengan DNA plasmid. Faktor-faktor yang mempengaruhi efisiensi transformasi yaitu lingkungan dan temperature. Sel-sel *E. coli* dan DNA plasmid melakukan interaksi secara produktif didalam lingkungan ion kalsium dan temperature rendah (0-5°C) dan bahwa penting adanya kejutan panas berikutnya (37-45°C). Faktor lain yang mempengaruhi yaitu pemasukkan ion-ion logam selain kalsium.(Old dan Primrose, 1989.)

Beberapa bahan yang digunakan untuk proses transformasi ini yaitu diantaranya antibiotik dan Kalsium Klorida. Kalsium Klorida mempengaruhi dan juga bertanggung jawab untuk mengikatkan DNA ke permukaan sel. Adanya ion  $Ca^{2+}$  dapat menyebabkan perubahan permeabilitas dinding sel bakteri sehingga plasmid DNA rekombinan yang berada dalam biakan sel bakteri akan masuk kedalam sel bakteri yang dinding selnya lebih permeabel tersebut.(Radji, 2011). Antibiotik digunakan sebagai penanda yang dapat diseleksi untuk sel-sel yang mengandung plasmid. Dengan penanda ini akan berkembang secara cepat resistensi yang penting. Antibiotik juga memperluas pengaruh ke biosintesis dinding sel hanya pada sel-sel yang telah berada pada proses pertumbuhan aktif. (Old dan Primrose, 1989)

## 2.8 Isolasi DNA Rekombinan

Prinsip dasar dari isolasi DNA plasmid yaitu sel bakteri yang mengandung DNA plasmid dibiakan dan dipanen. Sel bakteri kemudian di lisiskan dengan penambahan deterjen (EDTA) dan enzim lisozim, kemudian di sentrifugasi untuk memisahkan debris sel dengan ekstrak sel. Proses selanjutnya adalah memisahkan protein dan RNA dari DNA plasmid. Isolasi DNA plasmid harus memperhatikan keberadaan DNA genom yang berasal dari sel bakteri (Radji, 2011).

Presipitasi DNA dengan menggunakan etanol absolut atau isopropanol. Selain DNA, semua bahan yang lain akan larut dalam etanol dingin. Biasanya akan diperoleh supernatant DNA yang kental pada saat dimasukkan ke etanol

absolut. Etanol 70% dapat mengatasi hal tersebut.(Fatchiyah, Arumingtyas,Widyarti, Rahayu, 2011)

Salah satu hal yang dapat terjadi selama proses isolasi DNA yaitu terjadi kontaminasi. Kontaminan yang umum ditemukan diantaranya polisakarida yang dapat mengganggu proses lanjutan. Untuk menghindari terjadinya hal ini, maka jaringan yang digunakan dijaga tetap dingin sebelum dan selama proses isolasi. (Fatchiyah, Arumingtyas,Widyarti, Rahayu, 2011)

## 2.9 Elektroforesis Jel

Elektroforesis adalah metode tidak langsung yang dapat digunakan untuk memisahkan makromolekul, berdasarkan ukuran muatan listrik dan sifat-sifat fisis lainnya. (Campbell, Reece, Mitchell, 2002) Elektroforesis gel dapat memisahkan suatu campuran molekul DNA menjadi pita-pita yang masing-masing terdiri atas molekul DNA dengan panjang yang sama(Campbell, Reece, Mitchell, 2002)

Elektroforesis jel memisahkan makromolekul berdasarkan laju perpindahannya melewati suatu jel dibawah pengaruh medan listrik. Campuran asam nukleat atau protein ditempatkan didalam sumur didekat satu ujung lempeng tipis gel polimerik. Jel ini ditahan oleh pelat kaca dan direndam dalam larutan *aqueous*. Elektrode dilekatkan pada kedua ujung dan diberi tegangan. Setiap makromolekul kemudian bermigrasi kearah elektrode yang bermuatan berlawanan pada laju yang sebagian besar ditentukan oleh muatan dan ukuran molekulnya. Biasanya beberapa sampel yang berbeda, masing-masing merupakan campuran molekul, dimasukkan secara bersamaan ke dalam lajur majemuk pada jel lempeng. (Campbell, Reece, Mitchell, 2002)

Elektroforesis jel agarosa merupakan metode standar yang digunakan untuk identifikasi, pemisahan dan purifikasi fragmen DNA. Proses ini diawali dengan pemotongan DNA oleh enzim restriksi. Setiap enzim restriksi pada kondisi yang sesuai akan mengenali dan memotong DNA, sehingga dihasilkan fragmen-fragmen DNA. (Fatchiyah, Arumingtyas,Widyarti, Rahayu, 2011). Migrasi elektroforesis DNA melalui jel agarosa dipengaruhi oleh faktor ukuran dan konformasi molekul DNA, konsentrasi agarosa, arus listrik, dan suhu. Pewarna etidium bromide (EtBr) digunakan untuk alat identifikasi dan mengukur

semikualitatif fragmen DNA yang terpisah dalam jel. EtBr ini akan terikat diantara dua untai ganda DNA, sehingga pita DNA dalam gel agarosa akan berpendar karena pewarna ini mengandung zat fluoresen. Ikatan DNA-EtBr ini akan terekspos pada sinar UV level medium, sekitar panjang gelombang 300 nm.(Fatchiyah, Arumingtyas,Widyarti, Rahayu, 2011)

## 2.10 Imunisasi

Imunisasi merupakan prosedur untuk meningkatkan derajat imunitas, memberikan imunitas protektif dengan menginduksi respons memori terhadap patogen tertentu atau toksin dengan menggunakan preparat antigen nonvirulen/nontoksik. (Baratawidjaja, Rengganis, 2009)

Mekanisme yang terjadi pada saat imunisasi yaitu pada antigen yang pertama kali masuk ke dalam, terjadi respons imun yang ditandai dengan munculnya IgM beberapa hari setelah pemaparan. Kadar IgM mencapai puncaknya setelah kira-kira 7 hari. Enam sampai 7 hari setelah pemaparan, dalam serum mulai dapat dideteksi IgG, sedangkan IgM mulai berkurang sebelum kadar IgG mencapai puncaknya yaitu 10-14 hari setelah pemaparan antigen. Kadar antibodi kemudian berkurang dan umumnya hanya sedikit yang dapat dideteksi 4-5 minggu setelah pemaparan. Bila pemaparan antigen terjadi dua kali, terjadi respons imun sekunder yang sering juga disebut respons anamnestic atau *booster*. Baik IgM maupun IgG kadarnya cepat meningkat secara nyata. Puncak kadar IgM pada respons sekunder ini umumnya tidak melebihi puncaknya pada respons primer, sebaliknya kadar IgG meningkat jauh lebih tinggi dan berlangsung lebih lama.(Kresno, 2001)

Salah satu cara untuk meningkatkan kekebalan yaitu dengan cara pemberian vaksin. Berbagai macam cara pemberian vaksin yaitu intramuskular, subkutan, intradermal, intranasal, atau oral. Penyuntikan intramuskular dianjurkan pada kasus dimana bila dilakukan penyuntikan subkutan atau intradermal dapat menimbulkan iritasi, indurasi, perubahan warna kulit, peradangan, pembentukan granuloma. Pemberian suntikan secara subkutan mempunyai risiko pada jaringan neurovaskular lebih jarang, nonreaktogenik dan cukup imunogenik. (Sudoyo, Setyohadi, Alwi, Simadibrata, Setiati, 2006).

Penyuntikan intravena akan dapat mengurangi respons imun. Pemberian oral digunakan untuk imunisasi polio (sabin) galur virus yang dilemahkan yang dapat berkembang dalam mukosa usus kecil. Pemberian intranasal menginduksi sistem imun yang menyerupai pajanan alamiah terhadap patogen yang disebarkan melalui udara dan dapat memberikan respons berupa produksi antigen. (Baratawidjaja, Rengganis, 2009)

### **2.11 Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)**

*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) merupakan suatu metode pengujian serologi yang melekatkan kompleks ikatan antara antibodi dengan antigen didalam sumuran ELISA. ELISA dapat digunakan untuk mengevaluasi keberadaan antigen atau antibodi dalam suatu sampel, (Baratawidjaja dan Rengganis, 2009) untuk menentukan konsentrasi antibodi serum (misalnya pada tes HIV atau tes *West Nile virus*), untuk mendeteksi keberadaan antigen, dan dalam industri makanan digunakan untuk mendeteksi alergen makanan potensial seperti susu, kacang, dan telur. (Radji, 2010)

Prinsip ELISA adalah mereaksikan antigen yang tidak dilabel dan terdapat dalam spesimen, bersama antigen yang dilabel oleh enzim dengan antibodi spesifik, sehingga Antigen berlabel dan antigen dalam specimen akan berkompetisi untuk mengikat antibodi yang membentuk kompleks, antigen yang diberi label-antibodi-antigen. (Kresno, 2007)

Bergantung apa yang akan diuji, teknik ELISA harus ada antibodi atau antigen yang dikonjugasikan dengan enzim dan substrat yang sesuai enzim yang paling sering digunakan adalah fosfatase alkali (AP) dan horseradish peroxidase (HRP) sedangkan substrat yang paling sering digunakan adalah O-phenylenediamine (OPD) dan tetramethylbenzidine (TMB). (Kresno, 2007)

Terdapat dua cara ELISA yaitu ELISA secara langsung dan ELISA tidak langsung. ELISA secara langsung untuk mendeteksi antigen sedangkan ELISA tidak langsung untuk mendeteksi antibodi. ELISA tidak langsung yang digunakan juga untuk mendeteksi antibodi yang terdapat dalam serum (Radji, 2010)

Pengukuran ELISA dapat dilakukan dengan melihat perubahan warna yang terjadi sesuai dengan jumlah enzim yang diikat dan sesuai pula dengan kadar



antibodi yang dicari. (Baratawidjaja dan Rengganis, 2009). Selain itu, pengukuran ELISA dapat dilakukan menggunakan spektrofotometer dengan menentukan panjang gelombang yang sesuai. Penentuan panjang gelombang dilakukan dengan memilih dua panjang gelombang untuk mengurangi variasi antar sumuran dan untuk menghasilkan pengamatan yang sensitif. Panjang gelombang primer harus bertepatan dengan absorbansi puncak produk, sedangkan panjang gelombang sekunder harus bertepatan dengan dataran yang landai. (Burgess, 1995). Pengukuran juga dapat dilakukan secara otomatis menggunakan ELISA reader. (Radji, 2010)

## 2.12. Analisis Data (Sabri dan Hastono, 2010)

### 2.12.1 Uji Anova

Uji Anova merupakan uji yang digunakan dalam menganalisis beda lebih dari dua rata-rata. Uji ini disebut juga uji F. Prinsip uji anova yaitu melakukan telaah variabilitas data menjadi dua sumber variasi dalam kelompok (*within*) dan variasi antar kelompok (*between*). Bila variasi dalam kelompok dan antar kelompok sama, nilai perbandingan kedua varian sama dengan 1, maka rata-rata yang dibandingkan tidak ada perbedaan. Sebaliknya bila hasil perbandingan kedua varian tersebut menghasilkan nilai lebih dari 1, maka rata-rata yang dibandingkan menunjukkan ada perbedaan.

Perhitungan uji anova yaitu :

$$F = \frac{S_b^2}{S_w^2}$$

Keterangan :

$S_b^2$  = variansi antar perlakuan

$S_w^2$  = variansi dalam perlakuan

Hipotesis yang digunakan dalam pengujian ANOVA adalah :

- $H_0$  : Diduga bahwa seluruh kelompok dari rata-rata populasi adalah sama
- $H_i$  : Diduga bahwa seluruh kelompok dari rata-rata populasi adalah berbeda

Dasar dari pengambilan keputusan adalah :

- Jika  $F_{hitung} > F_{tabel 0,05}$ , maka  $H_0$  ditolak
- Jika  $F_{hitung} < F_{tabel 0,05}$ , maka  $H_0$  diterima

### 2.12.2 Uji *Post Hoc*

Uji *Post Hoc* disebut juga analisis *multiple comparison*. Analisis ini digunakan untuk mengetahui lebih lanjut kelompok mana saja yang berbeda meannya ketika pada pengujian anova dihasilkan ada perbedaan bermakna ( $H_0$  ditolak). Untuk mengetahui lebih lanjut perbedaan antar kelompok maka digunakan Uji *Post Hoc* dengan menggunakan salah satu fungsi *Tukey*.

Hipotesis yang digunakan dalam tes ini adalah :

- $H_0$  : kedua kelompok memiliki nilai rata-rata yang sama
- $H_1$  : kedua kelompok memiliki rata-rata yang berbeda

Dasar dari pengambilan keputusan yaitu :

- Jika probabilitas  $> 0,05$ , maka  $H_0$  diterima
- Jika probabilitas  $< 0,05$ , maka  $H_0$  ditolak

## **BAB 3**

### **METODE PENELITIAN**

#### **3.1 Tempat dan Waktu Penelitian**

Penelitian dilakukan di Laboratorium *Institute of Human Virus and Cancer Biology of University Indonesia* (IHVCB-UI), Gedung IASTH Salemba, Jakarta Pusat. Penelitian dilakukan selama 5 Bulan, yaitu dari bulan Februari sampai Juni 2012.

#### **3.2 Alat**

Alat-alat yang digunakan adalah mikropipet berbagai ukuran (20  $\mu$ L, 200  $\mu$ L, dan 1000  $\mu$ L)[Bio-rad], tip (1000  $\mu$ L, 200  $\mu$ L dan 10  $\mu$ L)[Sorenson], tabung mikrosentrifus 1,5 ml[axygen], Erlenmayer [Schott Duran], incubator [Inco 2], Shaker incubator [Ratex Adelab Scientific], sentrifugator [Sorvall Biofuge Primo], bio safety cabinet (BSC)[Esco], spin [Bio-rad], mesin vortex [heidolph reaxtop], perangkat elektroforesis [bio-rad], Gel Doc [Bio-Rad] timmer [Bio-rad], autoklaf [hirayama], apparatus elektroforesis [Bio-rad], timbangan elektrik [Adventurer TM Ohaus], lemari pendingin [sanyo], freezer -20°C [LG], ice maker [hoshizaki], tabung ukuran 15 ml dan 50 ml [Becton Dickson & Corning], gelas ukur [Iwaki pyrex], Scanner [Canon], Nanodrop[Biorad]computer [Samsung], sarung tangan [sensi gloves], masker [Pro-mask], parafilm [sigma], Syringe 1 ml [Terumo], Elisa reader [Bio-rad], *QIAprep Spin Column* (QSC) [QIAgen], QIA Filter Catridge [QIAgen], QIA-Tip 500 ml [Qiagen]

#### **3.3 Bahan**

##### **3.3.1 Bahan Uji**

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini didapatkan dari penelitian sebelumnya di Laboratorium *Institute of Human Virus and Cancer Biology of University Indonesia* (IHVCB-UI). Bahan yang digunakan terdiri dari dua macam

yaitu vaksin dan serum mencit yang dihasilkan dari imunisasi vaksin uji. Vaksin yang digunakan dalam penelitian ini yaitu vaksin pcDNA 3.1 HA-MPER-1 sebagai bahan uji dan vaksin pcDNA3.1 *wildtype*, sebagai kontrol negatif; vaksin pcDNA3.1 HA, sebagai kontrol positif. Sedangkan vaksin dan serum mencit yang didapat dari hasil imunisasi vaksin pcDNA3.1 HA-MPER-2, sebagai kelompok pembanding, diperoleh dari penelitian lain (Nurul Hasanah)

### 3.3.2 Bakteri

Bakteri yang digunakan untuk transformasi sel adalah bakteri *Eschericia coli* Top 10 dari Invitrogen.

### 3.3.3 Hewan Uji

Hewan percobaan yang digunakan adalah mencit betina galur BALB/c, bobot  $\pm 20$  g, dan berumur 6-8 minggu didapat dari Laboratorium Penelitian dan Pengujian Terpadu, Univeristas Gajah Mada, Yogyakarta. Jumlah mencit yang digunakan adalah 6 ekor untuk setiap kelompok yang dihitung berdasarkan rumus Federer (Walter T.S, 1963) sebagai berikut:

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

Dimana: t adalah jumlah perlakuan

n adalah jumlah pengulangan untuk tiap perlakuan

Pada penelitian ini,  $t = 4$ , maka  $n \geq 6$

### 3.3.4 Medium

Medium yang digunakan adalah medium Luria Bertani (LB) cair, Luria Bertani Agar [Himedia Laboratories Pvt.Ltd] dan Medium Super Optimal Catabolite (SOC).

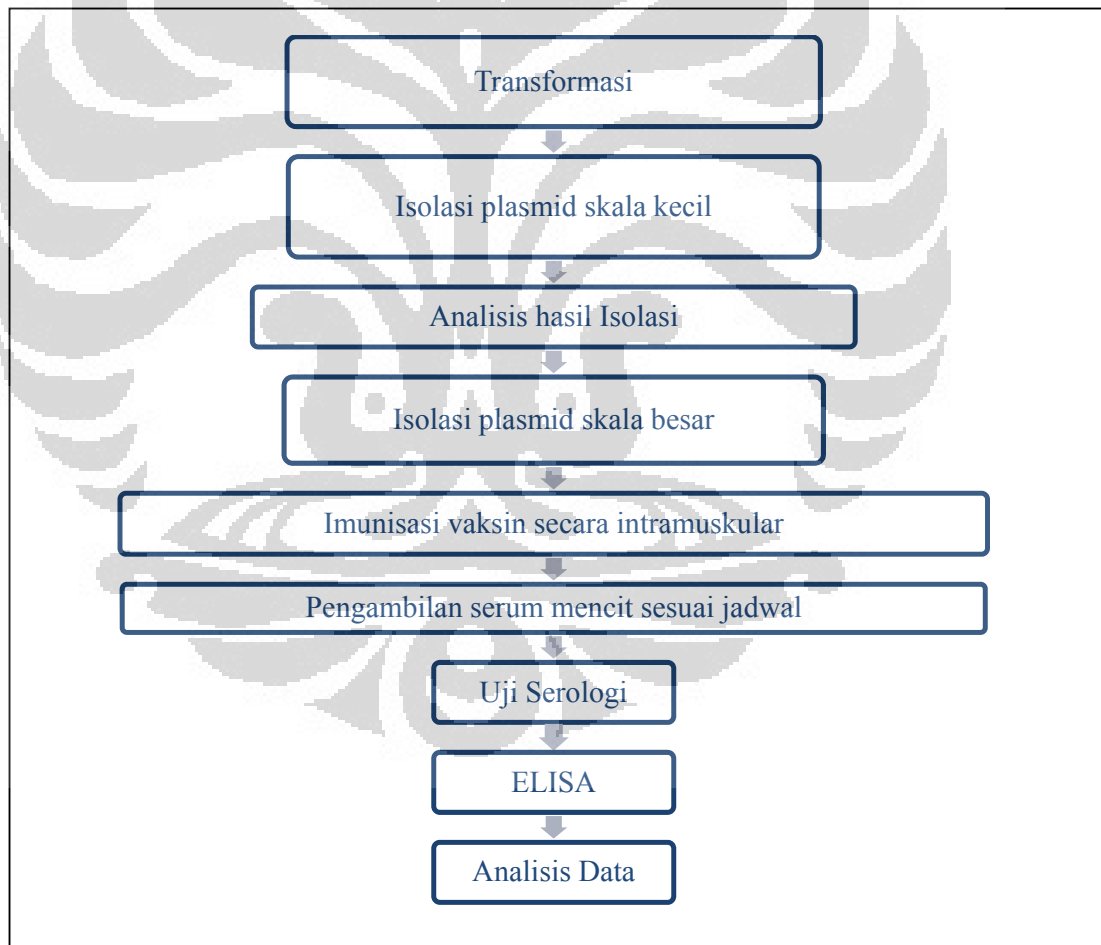
### 3.3.5 Bahan Kimia

Bahan Kimia yang digunakan meliputi akuades, alcohol 70% [Evita Pharmaceutical Laboratories], Ampisilin [Viccillinr 100], NaCl padat [Merck],

**Universitas Indonesia**

tripton[Sigma], tripton[Bio Basic Inc.], *Phosphate Buffered Saline (PBS)*[Sigma], H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> [Merck], Loading Buffer 6x[Fermentas], CaCl<sub>2</sub>, MgCl<sub>2</sub> [Merck], Gliserol [Promega] , Etanol [Merck], Ethidium Bromida [Invitrogen], Tween-20 [Bio Rad], DNA Ladder [Fermentas], SOC[Invitrogen], DMRIE-c [Invitrogen], Streptavidine-HRP [Chemicon], Gelatin [Bio-Rad], N3 [QIAGEN], PB [QIAGEN], EB [QIAGEN], Gel Agarosa [Promega], Buffer R[Fermentas], Enzim Hind3 [Fermentas], Buffer P1 [QIAGEN], Buffer P2 [QIAGEN], Larutan P3 [QIAGEN], Buffer QBT [QIAGEN], Larutan QC [QIAGEN], QF [QIAGEN], Isopropanol [Merck], *Coating Buffer* [Sigma], *Blocking Buffer*, PBS 1x [Sigma], Peptida ELDKWAS[1<sup>st</sup> Base], H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

### 3.4 Prosedur Kerja



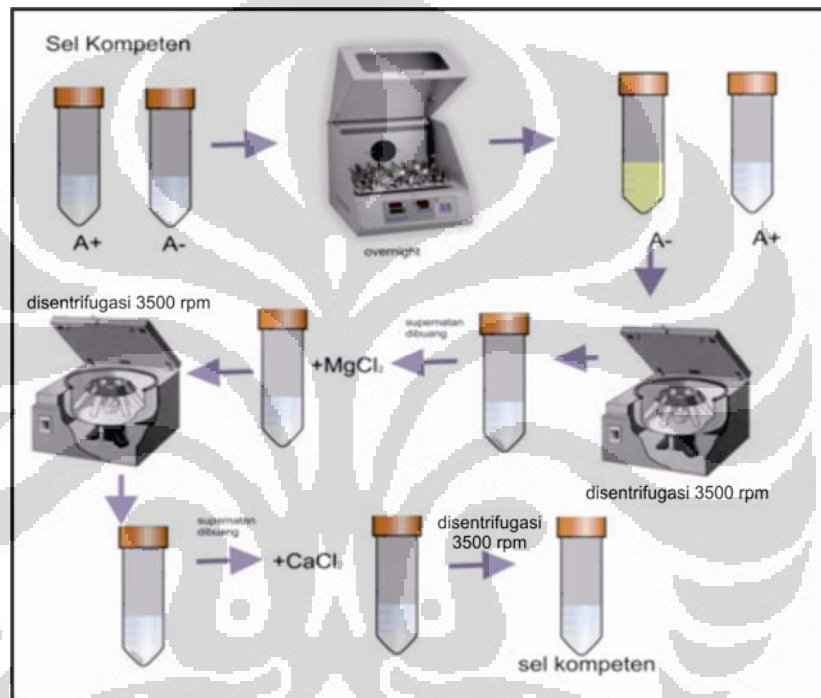
**Gambar 3.1.** Skema kerja penelitian

### 3.4.1 Pembuatan Larutan, Medium, dan *Buffer*

Pembuatan Larutan, Medium, dan *Buffer* dapat dilihat pada Lampiran 1 tabel 3.1.

### 3.4.2 Persiapan Plasmid

#### 3.4.2.1 Pembuatan sel *E.coli* TOP 10 kompeten



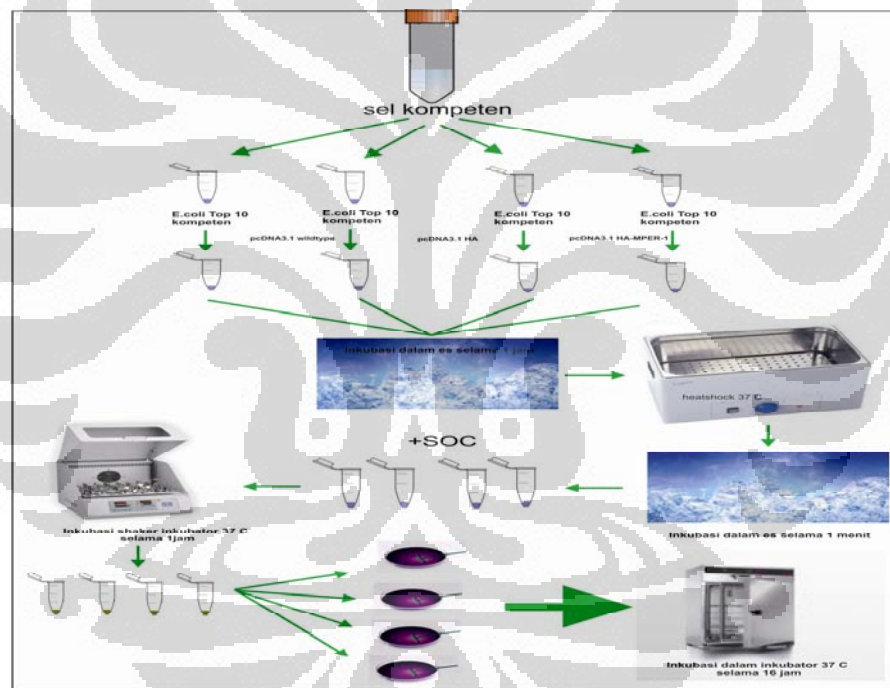
**Gambar 3.2.** Skema pembuatan sel *E.coli* TOP 10 kompeten

Sel kompeten dibuat berdasarkan metode Sambrook & Russell (2001). (Gambar 3.2) Langkah awal Pembuatan *E. coli* Top 10 kompeten dilakukan pembuatan kultur *overnight* dari *E. coli* TOP 10 pada media luria bertani (LB) sebanyak 4 mL. Tahap kedua, 100  $\mu$ L *E. coli* dibiakan dalam media cair LB 20 mL. Kemudian, campuran tersebut dikocok selama 2 jam dalam *shaker incubator* suhu 37°C. Setelah itu, campuran disentrifugasi selama 10 menit dengan kecepatan putaran 3500 rpm pada suhu 4°C.

Campuran yang telah diinkubasi dalam es selama 15 menit, disentrifugasi kembali selama 10 menit dengan kecepatan putaran 3500 rpm pada suhu 4°C.

Supernatan yang terbentuk dibuang. Sedangkan, pelet dilarutkan dengan 0,1 M Magnesium Klorida ( $MgCl_2$ ) dingin dengan 4 mL suspensi. Larutan tersebut diinkubasi kembali dalam es selama 15 menit, dan disentrifugasi selama 10 menit dengan kecepatan 3500 rpm pada suhu  $4^\circ C$ . Supernatan yang didapat kemudian dibuang. Pelet dilarutkan dengan 0,1 M Kalsium Klorida ( $CaCl_2$ ) dingin dengan 0,4 mL volume suspensi. Campuran tersebut diinkubasi kembali dalam es selama 60 menit, lalu disentrifugasi selama 10 menit dengan kecepatan 3500 rpm dan suhu  $4^\circ C$ . Supernatan yang terbentuk dibuang dan pelet dilarutkan dengan  $CaCl_2$  dingin sebanyak 200  $\mu L$ .

### 3.4.2.2 Transformasi plasmid rekombinan



**Gambar 3.3.** Skema transformasi plasmid rekombinan

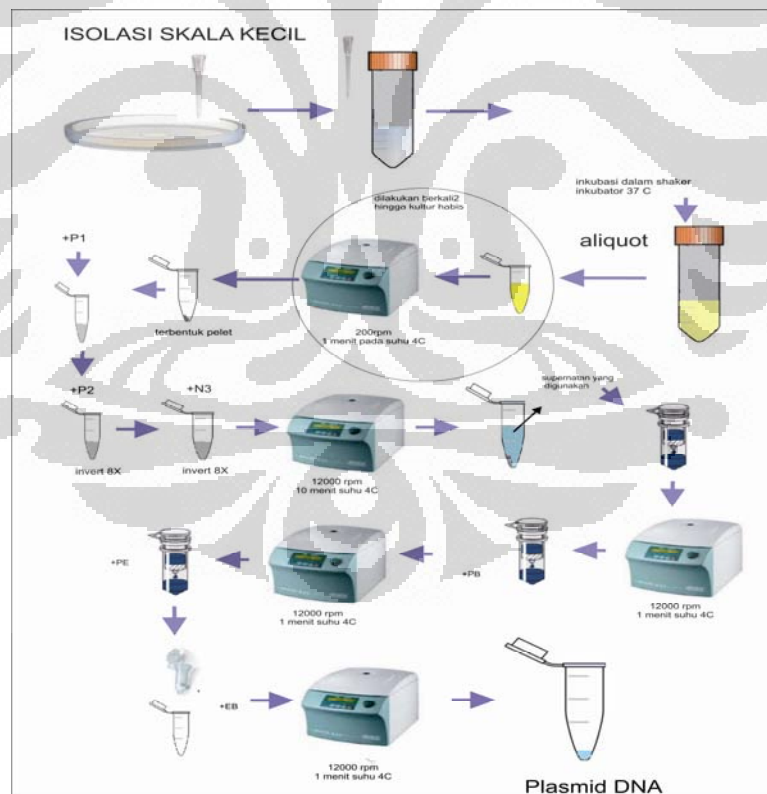
Transformasi dilakukan berdasarkan metode dari Sambrook & Russel (2001). (Gambar 3.3) Campuran pelet sel *E.coli* TOP 10 kompeten dibagi kedalam 4 buah tabung mikrosentrifus volume 1,5 mL masing-masing tabung berisi 50  $\mu L$  campuran pelet dengan  $CaCl_2$ . Tabung pertama yaitu kontrol negatif, hanya berisi *E.coli* TOP 10 kompeten sebanyak 50  $\mu L$ . Tabung kedua yaitu berisi 1  $\mu L$  pcDNA3.1 *wildtype* dan 50  $\mu L$  sel kompeten. Tabung ketiga yaitu berisi 1  $\mu L$

pcDNA3.1 HA dan 50  $\mu\text{L}$  sel kompeten, dan tabung keempat yaitu berisi 2  $\mu\text{L}$  pcDNA3.1 HA-MPER-1 dan 50  $\mu\text{L}$  sel kompeten. Masing-masing tabung, diinkubasi dalam es selama 1 jam.

Masing-masing tabung di-*heatshock* dalam *waterbath* 38°C selama 90 detik dan diinkubasi dalam es selama 60 detik. Medium *super optimal catabolite* (SOC) ditambahkan ke dalam masing-masing tabung sebanyak 200  $\mu\text{L}$  (4x volume kultur) dan diinkubasi kembali dalam *shaker inkubator* selama 1 jam pada suhu 37°C dengan pengocokan 200 rpm. Setelah itu, ditanam dalam media LB agar yang telah diberi ampicilin dan disebar menggunakan *spreader*. Terakhir, diinkubasi kembali selama 16 jam pada suhu 37°C.

### 3.4.3 Isolasi Plasmid

#### 3.4.3.1 Isolasi Plasmid Skala Kecil



**Gambar 3.4.** Skema isolasi plasmid skala kecil



Isolasi plasmid pcDNA3.1 dari *E.coli* TOP 10 dilakukan berdasarkan prinsip isolasi DNA alkali lisis (Ausubel *dkk*, 2002) menggunakan bahan dari QIAGEN.(Gambar 3.4) Biakan *E.coli* TOP 10 yang membawa pcDNA 3.1 dan DNA Rekombinan diinokulasi sebanyak 1 ose kedalam 100 mL medium LB cair yang telah ditambahkan ampisilin (50µg/mL) sebanyak 100 µL. kultur kemudian diinkubasi dengan pengocokan 200 rpm, pada suhu 37° C selama 16 jam. Kultur kemudian diinkubasi dengan pengocokan 200 rpm, pada suhu 37° C selama 16 jam. Kultur kemudian dipindahkan kedalam tabung falcon volume 50 mL dan disentrifugasi dengan kecepatan 4500 rpm selama 10 menit. Pelet kemudian dilarutkan lagi dengan supernatant kemudian dipindahkan ke dalam tabung mikrosentrifus volume 1,5 mL, kemudian disentrifus dengan kecepatan 12.000 rpm selama 2 menit.

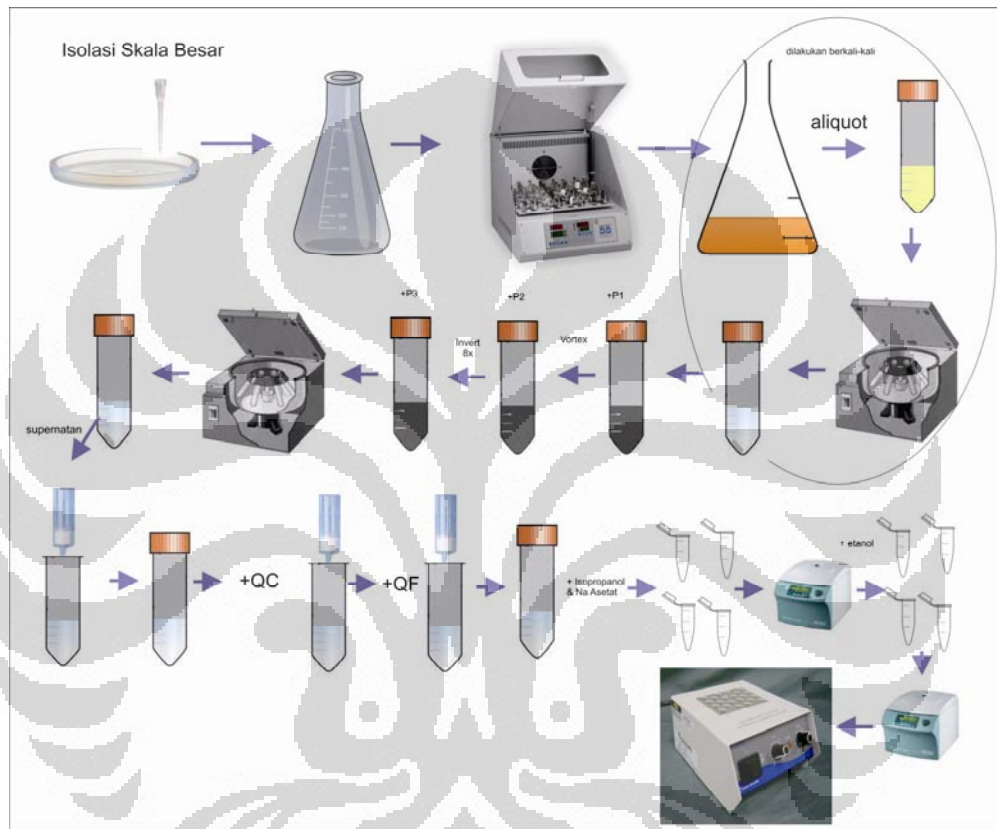
Pelet dilarutkan dengan larutan 125 µL P1 yang telah ditambahkan RNAse. Campuran kemudian dihomogenkan dengan menggunakan vortex. Campuran kemudian ditambahkan larutan P2 sebanyak 125 µL dan tabung dibolak-balik sebanyak 7 kali. Sebanyak 175 µL larutan N3 ditambahkan kedalam tabung, dan tabung dibolak-balik lagi sebanyak 6 kali kemudian diinkubasi dalam lemari pendingin selama 10 menit. Campuran kemudian di sentrifugasi dengan kecepatan 12.000 rpm selama 10 menit pada suhu 4°C.

Supernatan dipindahkan kedalam *QIAprep Spin Column* (QSC) yang pada bagian bawahnya telah diletakkan tabung koleksi, kemudian disentrifugasi selama 1 menit dengan kecepatan 12.000 rpm. Residu pada tabung koleksi dibuang sebanyak 100 µL *buffer* PB ditambahkan ke dalam QSC, kemudian disentrifugasi kembali dengan kecepatan 12.000 rpm selama 1 menit. Residu dalam tabung koleksi dibuang dan sebanyak 120 µL *buffer* PE yang telah diberikan etanol absolute ditambahkan kedalam QSC, tabung kemudian disentrifugasi kembali dengan kecepatan 12.000 rpm selama 1 menit. Residu pada tabung koleksi dibuang dan disentrifugasi kembali dengan kecepatan 12.000 rpm selama 1 menit.

*QIAprep Spin Column* (QSC) kemudian diletakkan diatas tabung tabung mikrosentrifus volume 1,5 mL steril dan ditambahkan sebanyak 50 µL *buffer* EB, kemudian diinkubasi pada suhu ruang (28-30°C) selama 1 menit. Campuran kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 12.000 rpm selama 1 menit. Residu

pada tabung mikrosentrifus berupa plasmid pcDNA3.1. Hasil isolasi kemudian divisualisasikan dengan elektroforesis gel agarosa 0,8% (b/v) pada tegangan 100 V selama 30 menit.

### 3.4.3.2 Isolasi Plasmid Skala Besar



**Gambar 3.5.** Skema isolasi plasmid skala besar

Plasmid rekombinan diisolasi dengan menggunakan metode alkali-lisis SDS berdasarkan Ausubel *dkk* (1990) dengan menggunakan kit dari QIAGEN. (Gambar 3.5) Isolasi plasmid skala besar dilakukan dengan pembuatan replikat dari hasil transformasi yang telah disekuensing. Transforman yang sudah dipastikan membawa DNA rekombinan bahan uji diinokulasikan kedalam 1 L medium Luria Bertani cair yang telah ditambahkan ampicillin 0,1 mM sebanyak 100  $\mu$ L. kultur diinkubasi pada *shaker incubator* dengan kecepatan 200 rpm, suhu 37°C selama 16 jam. Kultur kemudian dipindahkan ke dalam 6 tabung

sentrifugasi 50 mL dan disentrifugasi dengan kecepatan 9500 rpm selama 10 menit. Supernatan yang terbentuk di buang kemudian peletnya diambil.

Pelet dilarutkan dengan masing-masing 12 mL *buffer* P1, dan dihomogenkan dengan menggunakan *vortex*. Kemudian, *buffer* P2 ditambahkan ke dalam tabung sentrifugasi 50 mL sebanyak 12 mL. Tabung sentrifugasi 50 mL dibolak-balik sebanyak 8 kali. Setelah itu, *buffer* P3 ditambahkan ke dalam tabung sentrifugasi 50 mL sebanyak 12 mL. Lalu, tabung sentrifugasi 50 mL dibolak-balik sebanyak 8 kali. QIAfilter disiapkan dengan kondisi bagian bawah dari QIAfilter tertutup dengan penutup yang tersedia. Cairan supernatan diambil dan dimasukkan ke dalam QIAfilter. Inkubasi dilakukan selama 10 menit. Bagian pendorong QIAfilter dipasang. Penutup bawah QIAfilter dibuka. Lalu, lisat didorong keluar dan ditampung ke dalam tabung sentrifugasi baru. Inkubasi dilakukan selama 30 menit.

Sambil menunggu inkubasi, QAGEN-Tip 500 mL diaktifkan dengan menggunakan *buffer* QBT. *Buffer* QBT ditambahkan sebanyak 10 mL untuk mengaktifkan membran resin. Tip ditutup dengan menggunakan parafilm. Lisat yang telah diinkubasi selama 30 menit dimasukkan ke dalam tip dan dibiarkan menetes hingga habis. Perlakuan ini diulangi satu kali agar DNA semua terikat pada resin. *Buffer* QC dimasukkan sebanyak 20 mL untuk mencuci DNA dan dibiarkan menetes sampai habis dan prosedur tersebut dilakukan sekali lagi.

Tip dipindahkan ke dalam Tabung sentrifugasi 50 mL baru, kemudian 6 mL QN yang telah dipanaskan digunakan untuk melarutkan DNA. Isopropanol sebanyak 14 mL dengan Na Asetat 3M sebanyak 2 mL ditambahkan. masing-masing campuran tersebut dipindahkan secara alikuot ke dalam tabung mikrosentrifus volume 1,5 mL. Lalu, disentrifugasi kembali dengan kecepatan 12000 rpm selama 30 menit. Supernatan dibuang langsung tanpa menggunakan pipet. Kemudian pelet dicuci dengan 300  $\mu$ L etanol 70 % dan di sentrifugasi kembali dengan kecepatan 12000 rpm selama 15 menit. DNA dikeringkan dengan menempatkan tabung mikrosentrifus volume 1,5 mL pada *heatblock* dengan suhu 50-55°C. Setelah benar-benar kering, pelet kemudian di simpan dalam freezer. Kemudian, hasil dari isolasi plasmid skala besar ukur konsentrasinya dengan menggunakan nanodrop.

### 3.4.4 Analisis Hasil Isolasi Plasmid

#### 3.4.4.1 Elektroforesis Agarose 0,8 %

Elektroforesis dengan menggunakan jel agarose dilakukan untuk memastikan adanya gen sampel dari hasil isolasi plasmid. Gen sampel ditunjukkan dengan menggunakan marker. Marker yang digunakan yaitu marker 1 kb dari fermentas.

Hasil elusi DNA sebanyak 3  $\mu$ L ditambahkan dengan 3  $\mu$ L (6 kali *loading dye*). Kemudian dimasukkan sampel yang telah dicampur dengan *loading dye* ke dalam sumuran dalam jel agarosa dan dijalankan dalam *chamber* berisi buffer TAE 0,5 x selama 30 menit dengan tegangan 100 V. setelah terlihat terpisah, jel agarosa direndam dalam ethidium bromide selama 2 menit kemudian dimasukkan lagi kedalam *chamber* hingga proses elektroforesis selesai.

#### 3.4.4.2 Digesti plasmid dan DNA target

Metode yang digunakan untuk digesti plasmid dan DNA target adalah berdasarkan Ausubel *dkk* (1990) yang telah dimodifikasi. Setelah diketahui gen tersebut benar pada ukuran dalam pasang basa dengan menggunakan Elektroforesis agarosa, langkah selanjutnya dilakukan digesti. Plasmid DNA rekombinan yang telah diisolasi dipotong menggunakan enzim Hind III[Fermentas]. Campuran digest dibuat terlebih dahulu. Campuran digest terdiri dari *buffer R*, air destilasi, dan enzim Hind3 serta masing-masing sampel yang digunakan( pcDNA3.1 HA, pcDNA 3.1 *wildtype*, dan pcDNA3.1 HA-MPER-1). Kemudian campuran diinkubasi dalam inkubator pada suhu 37°C selama 2 jam. Lalu, tahapan elektroforesis agarosa 0,8% dilakukan kembali. Proses elektroforesis berhasil jika terbentuk pita DNA tunggal berukuran 5400 pb untuk pcDNA3.1 *Wildtype*, 7101 pb untuk pcDNA3.1 HA, serta 7122 pb untuk pcDNA3.1 HA-MPER-1.

#### 3.4.4.3 Nanodrop.

Nanodrop dilakukan untuk mengetahui konsentrasi dari DNA dalam *Elution Buffer*. Analisis Nanodrop dilakukan dengan menggunakan software Nanodrop 2000. Langkah awal yaitu dengan membuka program dan memilih analisis DNA. Setelah itu dilakukan pengukuran blanko terlebih dahulu dengan meneteskan blanko, yaitu *elution buffer*, kedalam tempat sampel sebanyak 1,5  $\mu\text{L}$ . setelah itu dilanjutkan dengan pengukuran sampel DNA sebanyak 1,5  $\mu\text{L}$ . sampel DNA akan terbaca dengan satuan konsentrasi dalam ng/  $\mu\text{L}$  dan absorbansi 260/280 dalam range 1,7-2.

#### 3.4.4.4. Sequencing fragmen 2F5 (ELDKWAS)

Proses sequencing fragmen ELDKWAS dari HA-MPER-1 dilakukan oleh staf peneliti IHVCB. Proses ini dilakukan untuk verifikasi hasil isolasi plasmid DNA rekombinan. Reaksi sekuensing dilakukan menggunakan ABI *BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit*. Sebelum melakukan proses sekuensing, persiapkan gambar letak sampel pada plate yang akan disekuensing dengan set primer yang akan digunakan. Selanjutnya, campuran reaksi yang akan digunakan disiapkan untuk sekuensing yang terdiri atas : 2  $\mu\text{L}$  5x *Sequencing buffer*, 4  $\mu\text{L}$  larutan *Big Dye Terminator*, 1  $\mu\text{L}$  primer sekuensing dan tambahkan *nuclease-free water* hingga total larutan 18  $\mu\text{L}$ . Pada proses ini diusahakan untuk meminimalisasi pajanan cahaya. Setelah itu, larutan campuran sebanyak 18  $\mu\text{L}$  tersebut dimasukkan ke dalam *plate* sekuensing. Tambahkan sebanyak 2  $\mu\text{L}$  isolasi skala kecil. *Plate* dimasukkan di mesin *Applied Biosistem analyzer*. Setelah itu, hasilnya data dapat dianalisis.

#### 3.4.5 Imunisasi Vaksin DNA

##### 3.4.5.1 Persiapan Hewan Uji

Mencit diaklimatisasi selama dua minggu dalam kandang Laboratorium IHVCB Universitas Indonesia agar dapat menyesuaikan diri dengan lingkungan baru. Mencit diberi makan dan minum yang seragam dan dilakukan pengamatan rutin terhadap keadaan umum dan penimbangan berat badan mencit. mencit yang

sehat memiliki ciri-ciri bulu bersih, mata bersinar, berat badan bertambah setiap hari dan tidak menunjukkan perilaku yang aneh. Mencit yang dinyatakan sehat dikelompokkan secara acak dengan jumlah enam ekor untuk tiap kelompoknya.

#### 3.4.5.2 Formulasi Vaksin

Untuk formulasi vaksin digunakan DMRIE-c [Invitrogen] dengan pelarut PBS 1x steril. Formulasi vaksin dibuat dengan menggunakan perbandingan molal antara DMRIE-c dengan DNA. Perbandingan molar DMRIE-c dan DNA yaitu 2:1. (Han, My Lien, 2007). Formulasi dilakukan dengan beberapa tahap. Tahap pertama dilakukan pengukuran berat molekul DNA terlebih dahulu dengan menggunakan rumus dari invitrogen

$$\text{Berat molekul DNA( } double \text{ strain)} = (\text{ukuran dna} \times 607,4) + 157,9$$

Ukuran DNA untuk pcDNA3.1 *wildtype* yaitu 5400 pb. Ukuran DNA untuk pcDNA3.1 HA yaitu 7101 pb. Ukuran DNA 3.1 HA-MPER-1 yaitu 7122 pb. Tahap kedua dilakukan pengukuran molaritas DNA. Massa yang dimasukkan kedalam rumus molaritas merupakan jumlah total dosis yang ingin disuntikkan ke mencit. Satu mencit memerlukan dosis 50 µg vaksin DNA, maka untuk 7 mencit diperlukan 350 µg vaksin DNA ditambah 100 µg vaksin DNA sebagai cadangan. Sedangkan volume yang dimasukkan kedalam rumus molaritas merupakan jumlah total volume yang ingin disuntikkan ke mencit. Satu mencit memerlukan volume 50 µL vaksin DNA, maka untuk 7 mencit diperlukan 350 µL vaksin DNA ditambah 100 µL vaksin DNA sebagai cadangan. Tahap selanjutnya menghitung molaritas DMRIE-c dengan menggunakan perbandingan molaritas yang sudah ada yaitu 2:1 (DMRIE-c-DNA). Tahap berikutnya, perhitungan dalam tabung mikrosentrifus volume 1,5 mL yang digunakan untuk satu kali penyuntikan. Satu tabung mikrosentrifus volume 1,5 mL dihitung terlebih dahulu konsentrasinya dalam ng/ul kemudian dikalikan dengan volume PBS sebagai *elution buffer* yang digunakan yaitu 20 µL. kemudian dikonversikan kedalam µg. Lalu, dosis total yang digunakan dalam satuan µg dibagi dengan konsentrasi yang per tabung mikrosentrifus volume 1,5 mL. Sehingga didapat jumlah total penyuntikan dalam tabung mikrosentrifus volume 1,5 ml yang digunakan.

### 3.4.5.3 Imunisasi dan Pengambilan Darah Mencit

Mencit yang digunakan dalam penelitian berumur 6-8 minggu. Penelitian menggunakan 6 ekor mencit setiap kelompok dan mencit yang digunakan galur BALB/c berjenis kelamin betina. Imunisasi diawali dengan preparasi vaksin sebagai antigen yang akan disuntikkan. Pertama, vaksin pcDNA3.1 HA-MPER-1, pcDNA3.1 *wildtype* dan pcDNA3.1 HA yang telah diformulasikan disiapkan dalam kondisi dingin dengan es.

Mencit yang belum diberi perlakuan diambil darah melalui *facial vein* pada wajah berada dibawah mandibula sebanyak 0,15 mL pada waktu 1 minggu sebelum imunisasi pertama, darah tersebut digunakan sebagai kontrol negatif. Sebelum imunisasi dilakukan sedasi menggunakan 0,03-0,04 mL campuran ketamin HCl 5 mL dan 1 mL xylazine 20 mg/mL yang diberikan secara intraperitoneal. Imunisasi kemudian dilakukan pada bagian otot paha secara intramuskular dengan volume 50 µg. dengan menggunakan vaksin pcDNA3.1 *wildtype*, sebagai kontrol negatif dan vaksin pcDNA3.1 HA sebagai kontrol positif dan dengan menggunakan Vaksin pcDNA3.1 HA-MPER-1, sebagai kelompok uji. Jadwal vaksinasi tertera pada tabel 3.2.

**Tabel 3.2** Jadwal vaksinasi mencit BALB/c betina

Minggu ke-	Perlakuan terhadap 4 kelompok perlakuan
Minggu ke-0	Pengambilan sampel darah 1
Minggu ke-1	Imunisasi pertama ( <i>prime booster</i> )
Minggu ke-3	Imunisasi kedua ( <i>booster 1</i> ), dan pengambilan sampel serum ke-2
Minggu ke-5	Imunisasi ketiga ( <i>booster 2</i> ), dan pengambilan sampel serum ke-3
Minggu ke-7	Pengambilan serum ke-4

Pengambilan darah dilakukan pada *facial vein* pada wajah berada dibawah mandibula mencit sebanyak 0,15 mL. Darah selanjutnya diinkubasi

dalam suhu ruang selama 2 jam kemudian disentrifuse 5000 rpm selama 10 menit. Supernatan yang diambil merupakan serum dan dipindahkan ke dalam tabung mikrosentrifuse 1,5 mL, lalu disimpan pada  $-20^{\circ}\text{C}$  untuk perlakuan lebih lanjut.

### 3.4.6 Uji Serologis

#### 3.4.6.1 ELISA

Cara Kerja ELISA diawali dengan pengenceran berseri dari peptida ELDKWAS sebanyak masing-masing 100  $\mu\text{g/mL}$ , 50  $\mu\text{g/mL}$ , 25  $\mu\text{g/mL}$ , dan 12,5  $\mu\text{g/mL}$  dalam *coating buffer*. Kemudian masing-masing *peptide coating* dimasukkan sebanyak 100  $\mu\text{L}$  ke dalam sumur pelat ELISA. Pelapisan peptida dilakukan pada suhu  $4^{\circ}\text{C}$  selama semalam ( $\pm 16$  jam). Pelat yang telah diinkubasi selama semalam kemudian dicuci sebanyak 4 kali dengan 200  $\mu\text{L}$  larutan pencuci (PBS-Tween) untuk menghilangkan sisa peptida yang tidak menempel pada pelat. Setelah proses pelapisan pelat selesai, kemudian antigen diblok dengan menambahkan 100  $\mu\text{L}$  *buffer blocking*, lalu diinkubasi selama 2 jam pada suhu  $37^{\circ}\text{C}$ . Pelat selanjutnya dicuci sebanyak 4 kali dengan 200  $\mu\text{L}$  larutan pencuci.

Sebanyak 50  $\mu\text{L}$  serum mencit yang telah diencerkan dimasukkan ke dalam ELISA. Optimasi konsentrasi serum dilakukan dengan pengenceran berseri 1/12,5, 1/25, 1/50 dan 1/100 dalam bufer pengencer. Antibodi pertama diinkubasi pada  $4^{\circ}\text{C}$  selama 6 jam. Setelah satu jam kemudian pelat dicuci sebanyak 4 kali dengan 200  $\mu\text{L}$  larutan pencuci. Selanjutnya ke dalam setiap sumur dimasukkan 50  $\mu\text{L}$  larutan antibodi kedua berlabel biotin yang mengenali Imunoglobulin G mencit dengan pengenceran 1/5000 dalam 0,1% gelatin dalam PBS 1x untuk meningkatkan spesifisitas ikatan antigen-antibodi. Reaksi dilakukan pada suhu  $37^{\circ}\text{C}$  selama 1 jam. Setelah dilakukan 4 kali pencucian, ke dalam setiap sumuran dimasukkan 50  $\mu\text{L}$  larutan streptavidin-HRP dengan pengenceran 1/1000 dalam PBS 1x. Pelat ELISA diinkubasi pada suhu  $37^{\circ}\text{C}$  selama 1 jam. Setelah dilakukan 4 kali pencucian lalu 50  $\mu\text{L}$  substrat OPD ditambahkan ke dalam pelat ELISA. Pelat didiamkan pada suhu ruang dengan kondisi minim cahaya sampai terbentuk warna (5-15 menit), kemudian ditambahkan 25  $\mu\text{L}$  2,5 M  $\text{H}_2\text{SO}_4$ . Intensitas warna diukur dengan ELISA *reader* dan pembacaan *Optical Density* (OD) dilakukan pada panjang gelombang 490 nm.



### 3.4.7 Analisis Data

Hasil pengujian respons antibodi spesifik dalam serum hewan uji terhadap vaksin pcDNA3.1 HA-MPER-1, vaksin pcDNA3.1 HA dan vaksin pcDNA3.1 *wildtype* diukur menggunakan uji statistik untuk melihat perbedaan masing-masing perlakuan terhadap kadar antibodi. Uji statistik tersebut yaitu uji Anova. Pemberian vaksin sebagai perlakuan (*independent variable*) dan kadar antibodi sebagai kontrol (*dependent variable*). Kemudian dilanjutkan dengan membandingkan kadar antibodi pada masing-masing kelompok waktu pengambilan serum dengan perbandingan berganda Uji Tukey (*Multiple comparison*).



## BAB 4 HASIL DAN PEMBAHASAN

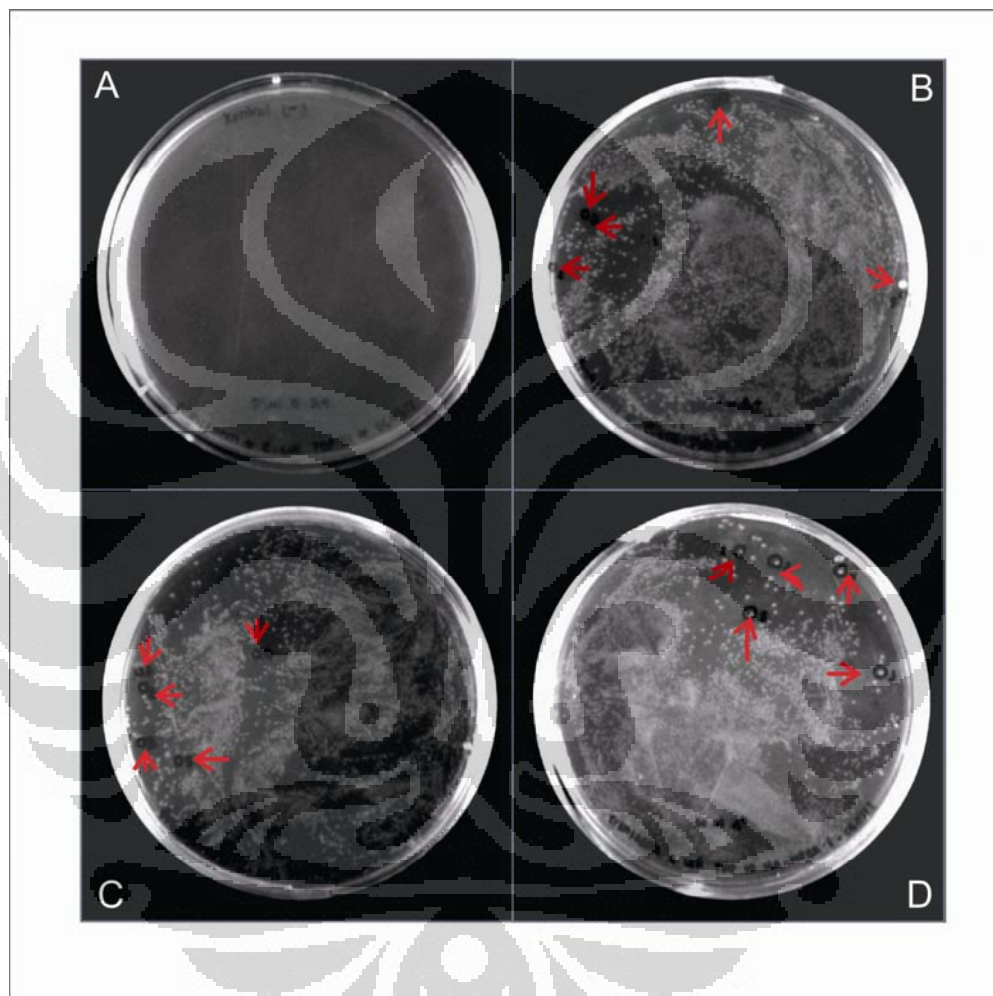
### 4.1 Pembuatan *E.coli* TOP 10 Kompeten dan Transformasi Sel

Pembuatan *E. coli* TOP 10 kompeten bertujuan untuk membuat dinding sel bakteri menjadi permeabel sehingga DNA rekombinan yang telah disisipkan kedalam plasmid sistem ekspresi sel mamalia dapat dimasukkan kedalam bakteri. Proses ini diawali dengan pengkulturan *E.coli* TOP 10 selama 16 jam. Sel *E.coli* ditumbuhkan sampai kedalam fase log atau fase pertumbuhan eksponensial. (Ausubel, 1990). Sel bakteri di tambahkan larutan MgCl<sub>2</sub> dingin. Pemasukkan ion-ion logam akan mempengaruhi permeabilitas dinding sel bakteri. Sel kemudian ditambahkan larutan CaCl<sub>2</sub>. Kalsium Klorida mempengaruhi ikatan DNA permukaan sel. Selain itu, adanya ion Ca<sup>2+</sup> dapat menyebabkan perubahan permeabilitas dinding sel bakteri sehingga plasmid DNA rekombinan yang berada dalam biakan sel bakteri akan masuk melewati dinding yang telah permeabel (Radji, 2011).

Setelah sel kompeten dibuat, dilakukan proses transformasi. Transformasi merupakan proses dimana plasmid DNA rekombinan diperkenalkan kedalam sel inang bakteri. Plasmid DNA rekombinan yang telah dibuat oleh peneliti sebelumnya dimasukkan kedalam sel kompeten kemudian dilakukan inkubasi selama 1 jam pada temperatur rendah (0-5<sup>0</sup>C). Setelah itu, dilakukan *heat shock* pada suhu 37<sup>0</sup>C. perlakuan ini bertujuan agar DNA dapat masuk kedalam sel dengan efisien. Lalu, sel ditumbuhkan kedalam medium nonselektif. Di dalam sel akan tersintesis gen pengkode ampisilin resisten. Sehingga, saat bakteri ditanam pada media selektif yaitu ampisilin sel bakteri akan bersifat selektif atau dalam arti lain hanya bakteri yang memiliki plasmid rekombinan yang dapat tumbuh pada medium luria bertani agar dengan ampisilin.

Hasil transformasi plasmid DNA rekombinan dapat dilihat pada gambar 4.1. pada kelompok uji vaksin pcDNA3.1 *wildtype*, vaksin pcDNA3.1 HA serta vaksin pcDNA3.1 HA-MPER-1 terdapat koloni bakteri. Sedangkan pada

kelompok kontrol negatif yaitu *E.coli* TOP 10 kompeten tidak terdapat koloni bakteri. Hal ini disebabkan karena pada kelompok kontrol tidak mempunyai plasmid yang memiliki situs ampisilin resisten yang dibawa oleh plasmid pcDNA3.1. dari hasil transformasi ini, dipilih 5 koloni yang ukurannya sedang dan terjauh dari koloni lainnya untuk dilakukan isolasi plasmid skala kecil.



Keterangan gambar :

(A) Hasil transformasi *E.coli* Top 10 kompeten tidak terdapat pertumbuhan koloni (-)

(B) Hasil transformasi pcDNA3.1 *Wildtype* terdapat pertumbuhan koloni (+),

(C) Hasil transformasi pcDNA3.1 HA terdapat pertumbuhan koloni (+),

(D) Hasil transformasi pcDNA3.1 HA-MPER-1 terdapat pertumbuhan koloni (+)

Tanda panah warna merah menunjukkan koloni yang dipilih untuk dilakukan isolasi skala kecil

**Gambar 4.1.** Hasil transformasi sel dalam plate agar ampisilin.

## 4.2 Isolasi Plasmid

### 4.2.1 Isolasi Plasmid Skala Kecil

Isolasi plasmid skala kecil dilakukan berdasarkan prinsip isolasi DNA alkali lisis (Ausubel *dkk*, 2002) dengan menggunakan kit dari *QIAGEN plasmid Miniprep*(2006). Metode alkali lisis memberikan keuntungan terhadap DNA sirkular. DNA sirkular akan terdenaturasi dengan cepat pada tahap neutralisasi atau pendinginan, sedangkan DNA genom tidak akan mengalami denaturasi dan tetap tertahan dengan protein, *sodium dodecyl sulfate* (SDS), dan lipid yang terpresipitasi. Isolasi DNA plasmid yang menggunakan kit dari QIAGEN memiliki prinsip pengikatan DNA plasmid pada resin *anion exchange* dibawah kondisi rendah garam dan pH yang sesuai.

*Buffer P1* yang digunakan pada langkah awal isolasi berisi Tris-Cl dan EDTA serta penambahan RNase. *Buffer P1* digunakan untuk meresuspensikan pelet sel bakteri dan melisis dinding sel bakteri. Fungsi EDTA yaitu sebagai perusak sel dengan cara mengikat ion magnesium sebagai prekursor enzim sehingga enzim menjadi tidak aktif sedangkan Tris-HCl digunakan untuk memberikan kondisi pH optimum. Dalam *buffer P1* terdapat RNase. RNase digunakan untuk memisahkan protein dan RNA sebagai kontaminan dari DNA plasmid.

*Buffer P2* digunakan untuk mendenaturasi DNA genom, DNA plasmid, protein dan sel debris oleh *Sodium Dodecyl Sulfate* (SDS) dan NaOH. SDS akan mendenaturasi protein bakteri dengan cara mendenaturasi fosfolipid. sedangkan NaOH akan mendenaturasi kromosom dan plasmid DNA. (Ausubel *dkk*, 2002).

*Buffer P3* dan N3 berisi Kalium Asetat. Proses ini menyebabkan plasmid DNA *reannealing* secara cepat. Kebanyakan DNA kromosomal dan protein bakteri mengendap. Hal ini terjadi karena adanya reaksi dari SDS yang membentuk kompleks dengan kalium sedangkan DNA plasmid akan tetap berada didalam larutan atau supernatant.

Supernatan yang terbentuk kemudian dipindahkan kedalam QIAprep Spin Column (QSC) yang bagian bawahnya telah diletakkan tabung koleksi. Pada tahapan ini, plasmid DNA rekombinan diharapkan tersangkut pada resin dalam QSC. Kemudian, dilakukan pencucian dengan menggunakan *buffer* PB untuk menghilangkan kontaminan yaitu berupa polisakarida. Tahap terakhir dari isolasi plasmid skala kecil yaitu melarutkan plasmid DNA rekombinan dengan menggunakan *elution buffer* dengan volume yang kecil.

#### 4.2.2 Isolasi Plasmid Skala Besar

Sama halnya dengan isolasi plasmid skala kecil, isolasi plasmid skala besar menggunakan prinsip isolasi DNA alkali lisis (Ausubel *dkk*, 2002) dengan menggunakan kit dari QIAGEN plasmid Maxiprep (2005). Isolasi plasmid skala besar bertujuan untuk mendapatkan plasmid DNA rekombinan dalam konsentrasi yang lebih besar sehingga konsentrasi yang diperoleh dapat digunakan sebagai dosis penyuntikan vaksin DNA. Oleh karena itu, isolasi skala besar dilakukan beberapa kali hingga didapatkan dosis penyuntikan vaksin DNA yang cukup.

Perbedaan isolasi plasmid skala kecil dengan plasmid skala besar yaitu pada kultur *overnight* yang digunakan. Pada isolasi skala besar digunakan 1 L medium LB broth sedangkan pada isolasi skala kecil hanya digunakan 4 mL LB broth. Kit yang digunakan dalam isolasi plasmid skala besar yaitu QIA tip-500 mL, sedangkan pada isolasi plasmid skala kecil digunakan QIAprep Spin Column(QSC). Koloni yang digunakan pada isolasi plasmid skala besar diperoleh dari hasil isolasi skala kecil yang telah disequensing sedangkan pada isolasi skala kecil koloni yang digunakan berasal dari seleksi hasil transformasi. *Elution buffer* yang digunakan pada isolasi plasmid skala kecil yaitu *phosphate buffer saline* (PBS), *elution buffer* yang aman digunakan sebagai pelarut vaksin DNA.

Pada pcDNA3.1 *wildtype*, koloni yang dipilih untuk isolasi skala besar yaitu koloni nomor 1. Isolasi plasmid skala besar dilakukan sebanyak 3 kali. Isolasi pertama didapatkan 16 tabung mikrosentrifus volume 1,5 mL dengan konsentrasi per tabung yaitu 1500 ng/ $\mu$ L dalam 20  $\mu$ L PBS. kemurnian plasmid yang diperoleh pada isolasi pertama yaitu berada diantara 1,7-2. Isolasi kedua

didapatkan 16 tabung mikrosentrifus volume 1,5 mL dengan konsentrasi per tabung 2500 ng/ $\mu$ L dalam 20  $\mu$ L PBS dengan kemurnian plasmid berkisar antara 1,7-2. Isolasi ke tiga didapatkan 16 tabung mikrosentrifus volume 1,5 mL dengan konsentrasi per tabung 3500 ng/ $\mu$ L dalam 20  $\mu$ L PBS dengan kemurnian plasmid berkisar antara 1,7-2.

Pada pcDNA 3.1 HA, koloni yang dipilih untuk isolasi skala besar yaitu koloni nomor 3. Isolasi plasmid skala besar dilakukan sebanyak 2 kali. Isolasi pertama didapatkan 16 tabung mikrosentrifus volume 1,5 mL dengan konsentrasi per tabung yaitu 1436 ng/ $\mu$ L dalam 20  $\mu$ L PBS. kemurnian plasmid yang diperoleh pada isolasi pertama yaitu berada diantara 1,7-2. Isolasi kedua didapatkan 16 tabung mikrosentrifus volume 1,5 mL dengan konsentrasi per tabung mikrosentrifus volume 1,5 ml 2800 ng/  $\mu$ L dalam 20  $\mu$ L PBS dengan kemurnian plasmid berkisar diantara 1,7-2.

Pada pcDNA3.1 HA-MPER-1, koloni yang dipilih untuk isolasi skala besar yaitu koloni nomor 5. Isolasi plasmid skala besar dilakukan sebanyak 2 kali. Isolasi pertama didapatkan 16 tabung mikrosentrifus volume 1,5  $\mu$ L dengan konsentrasi per tabung yaitu 2140,7 ng/ $\mu$ L dalam 20  $\mu$ L PBS. kemurnian plasmid yang diperoleh pada isolasi pertama yaitu berada diantara 1,7-2. Isolasi kedua didapatkan 16 tabung mikrosentrifus volume 1,5 mL dengan konsentrasi per tabung 2911,1  $\mu$ g/  $\mu$ L dalam 20  $\mu$ L PBS dengan kemurnian plasmid berkisar diantara 1,7-2.

#### **4.3. Visualisasi Hasil Isolasi dan Konfirmasi Hasil Isolasi dengan Sekuensing**

##### **4.3.1 Visualisasi Hasil Isolasi Skala Kecil dan Skala Besar dengan Elektroforesis Agarosa 0,8%**

Hasil isolasi skala kecil pcDNA 3.1 *wildtype*, pcDNA3.1 HA dan pcDNA3.1 HA-MPER 1 divisualisasi dengan elektroforesis jel agarosa 0,8 %, 100 V selama 30 menit.(Gambar 4.2 dan Gambar 4.3) Isolasi DNA

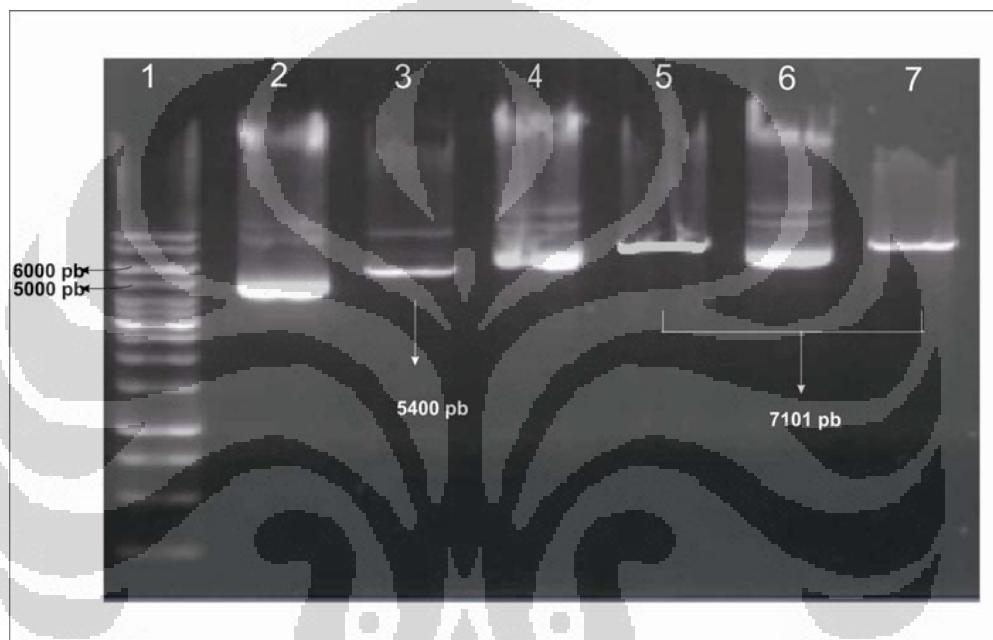
plasmid menyebabkan terbentuk tiga konfigurasi struktur DNA yaitu *supercoiled circular*, *nicked circular*, dan *linear*. Konfigurasi *nicked circular* dapat terbentuk selama proses isolasi karena aktivitas enzim *deoxyribonuclease* (DNase). Kontaminasi endonuklease pada plasmid yang diisolasi dapat menyebabkan terbentuknya konfigurasi DNA linier. Selain itu, konfigurasi linier juga dapat disebabkan karena perlakuan yang keras selama isolasi DNA plasmid (Scaphepler *dkk.* 2000). Berdasarkan QIAGEN (2005), konfigurasi DNA plasmid tersebut terbentuk karena disebabkan oleh waktu inkubasi saat tahap pelisisan dengan *buffer* P2 yang terlalu lama.

Konfigurasi DNA *supercoiled circular* bermigrasi lebih cepat pada gel agarosa yang kemudian diikuti dengan linier dan *nicked circular*. Hal tersebut disebabkan karena DNA *supercoiled* menggulung menjadi struktur yang padat sehingga DNA *supercoiled* merupakan konformasi yang bergerak paling cepat di dalam gel. Konfigurasi DNA linier bermigrasi lebih cepat dibandingkan dengan *nicked circular* (Bjornsti & Osheroff, 2001). Proses tanpa digesti akan membuat DNA dalam bentuk sirkuler dan *supercoiled* sehingga hasil yang didapat dalam gel agarosa kurang begitu jelas. Oleh karena itu, dilakukan digesti untuk membuat DNA menjadi bentuk linear sehingga ukuran DNA dapat terlihat dengan jelas. (Gambar 4.3)



Keterangan gambar. Lajur 1 Marker Gen Ruler DNA Ladder 1 kb [Fermentas], lajur 2 pcDNA 3.1 *Wildtype* koloni 1, lajur 3 pcDNA 3.1 HA koloni 1, lajur 4 pcDNA 3.1 HA koloni 2, lajur 5 pcDNA 3.1 HA koloni 3, lajur 6 pcDNA3.1 HA koloni 4, lajur 7 pcDNA3.1 HA-MPER-1 koloni 1, lajur 8 pcDNA3.1 HA-MPER-1 koloni 2, lajur 9 pcDNA3.1 HA-MPER-1 koloni 3, lajur 10 pcDNA3.1 HA-MPER-1 koloni 5.

**Gambar 4.2.** Visualisasi dengan elektroforesis agarosa 0,8% hasil isolasi skala kecil dari 5 koloni terpilih hasil transformasi pada kelompok pcDNA3.1 *wildtype*, pcDNA3.1 HA, pcDNA3.1 HA-MPER-1



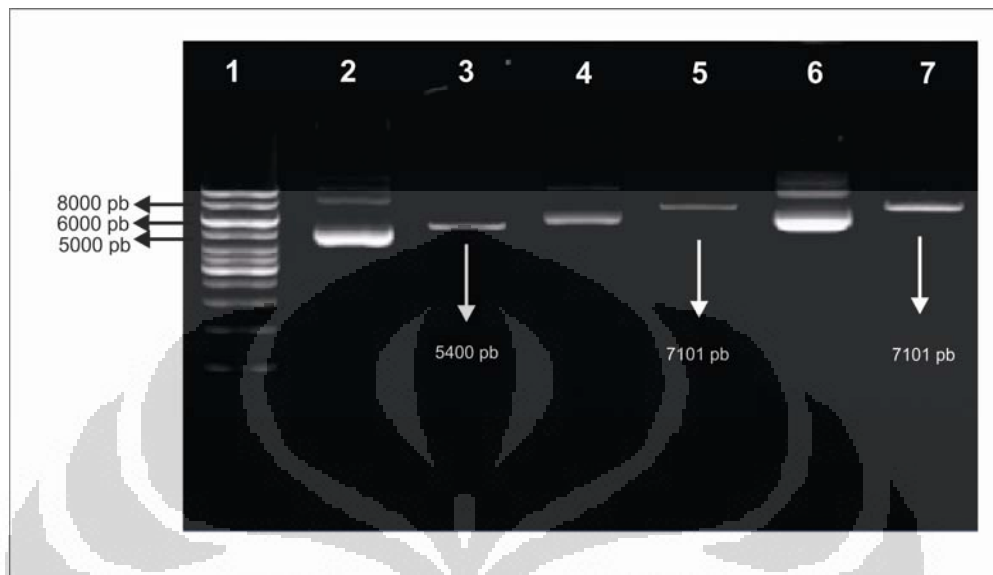
Keterangan gambar. Lajur 1 Marker Gen Ruler DNA Ladder 1 kb [Fermentas], lajur 2 pcDNA 3.1 *Wildtype*, lajur 3 pcDNA 3.1 *Wildtype* restriksi dengan enzim Hind III [Fermentas] menunjukkan ukuran DNA 5400 pb, lajur 4 pcDNA 3.1 HA menunjukkan ukuran DNA 7100 pb, lajur 5 pcDNA 3.1 HA restriksi dengan enzim Hind III [Fermentas] menunjukkan ukuran DNA sebesar 7100 pb, Lajur 6 pcDNA 3.1 HA-MPER-1 menunjukkan ukuran DNA sebesar 7100, lajur 7 pcDNA 3.1 HA-MPER-1 restriksi dengan enzim Hind III [Fermentas] menunjukkan ukuran DNA sebesar 7100 pb

**Gambar 4.3.** Visualisasi hasil isolasi skala kecil dibandingkan dengan hasil digest dengan enzim Hind III [Fermentas] dilihat dengan elektroforesis agarosa 0,8%

Pada isolasi skala besar, harus dilakukan pengenceran plasmid terlebih dahulu. Pengenceran plasmid dilakukan untuk memperkecil konsentrasi yang dihasilkan dari isolasi plasmid skala besar. Karena pada umumnya pada isolasi skala besar didapatkan hasil ratusan hingga ribuan nanogram sehingga dapat mengurangi kejelasan hasil visualisasi. Selain itu, penenceran dimaksudkan untuk



mengefektifkan kerja enzim restriksi. Hasil isolasi skala besar dapat dilihat pada gambar 4.4.



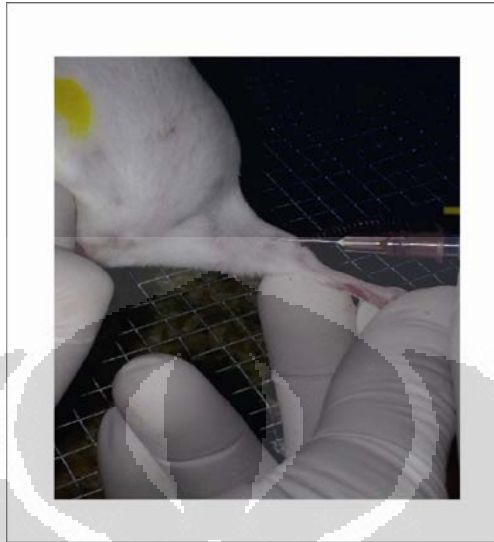
Keterangan gambar. Lajur 1 Marker Gen Ruler DNA Ladder 1 kb [Fermentas], lajur 2 pcDNA 3.1 *Wildtype*, lajur 3 pcDNA 3.1 *Wildtype* restriksi dengan enzim Hind III [Fermentas], lajur 4 pcDNA 3.1 HA, lajur 5 pcDNA 3.1 HA restriksi dengan enzim Hind III [Fermentas], Lajur 6 pcDNA 3.1 HA-MPER-1, lajur 7 pcDNA 3.1 HA-MPER-1 restriksi dengan enzim Hind III [Fermentas]

**Gambar 4.4.** Visualisasi hasil isolasi skala besar dengan elektroforesis agarosa 0,8% dengan konsentrasi 50 ng/ $\mu$ L

#### 4.3.2 Konfirmasi insersi fragmen HA-MPER-1

Hasil sekuensing fragmen HA-MPER-1 menunjukkan adanya epitop ELDKWAS pada pcDNA 3.1 HA-MPER-1. Hasil sekuensing menunjukkan adanya sisipan antara asam amino leusin (CTG) dengan glisin (GGA) yang merupakan daerah sisipan situs antigenik pertama pada gen HA virus influenza H5N1. Epitop ELDKWAS terdiri dari 7 buah asam amino. Asam amino E (Asam Glutamat) terdiri dari 3 pasang basa yaitu GAA, L (Leusin) terdiri dari 3 pasang basa yaitu CTC, D (Asam Aspartat) terdiri dari 3 pasang basa yaitu GAT, K (Lisin) terdiri dari 3 pasang basa yaitu AAA, W (Triptopan) terdiri dari 3 pasang basa yaitu TGG, A (Alanin) terdiri dari 3 pasang basa GCT, S (Serin) terdiri dari 3 pasang basa AGC.

#### 4.4 Imunisasi Vaksin



**Gambar 4.5.** Imunisasi vaksin plasmid DNA rekombinan pada otot paha mencit BALB/c betina

Sebelum diimunisasi vaksin diformulasikan terlebih dahulu. formulasi vaksin yang digunakan untuk vaksin DNA ini menggunakan formulasi liposom kationik. Liposom kationik telah digunakan secara ekstensif selama kurang lebih 5 tahun sebagai sistem penghantaran DNA, mRNA, Antisense-oligomer dan protein ke sel hidup. Liposom kationik ini telah digunakan pada uji klinis pada terapi gen untuk manusia. Bagian sitofektin, sebagai bagian yang bermuatan positif dari molekul lipid, dapat memfasilitasi masuknya polinukleotida, makromolekul dan molekul kecil ke dalam sel hidup. (Felgner *dkk*, 1993) Tiga fungsi dari liposom kationik ini yaitu sebagai penangkap polinukleotida bermuatan negatif dengan mekanisme reaksi kondensasi, meningkatkan mekanisme *uptake* selular dalam kaitannya dengan interaksi kompleks yang bermuatan positif dengan permukaan biologis yang negatif, dan sebagai fusi membrane dengan plasma atau endosom agar dapat terhantarkan kedalam sitoplasma tanpa adanya degradasi. (Felgner *dkk*, 1993). Liposom kationik yang digunakan pada penelitian kali ini yaitu DMRIE-C. dalam DMRIE-c terkandung DMRIE ((1,2-dimyristyloxy-propyl-3-dimethyl-hydroxy ethyl ammonium

bromide) dan kolesterol dengan perbandingan molal 1 : 1. Penggunaan DMRIE-c juga diharapkan dapat meningkatkan respons imun dalam tubuh. (Margalith, Adrian, 2006)

Selain menggunakan liposom kationik, *Phosphat Buffer Saline* (PBS) digunakan untuk melarutkan DNA. PBS terdiri dari 154 mM NaCl dan 10 mM Sodium Fosfat. Beberapa peneliti menggunakan saline sebagai pembawa DNA plasmid untuk penyuntikan karena NaCl isotonik, stabil, tidak toksik dan umum digunakan untuk penyuntikan intramuskular pada obat-obatan. Sebuah penelitian menyebutkan bahwa plasmid DNA dengan pembawa PBS menghasilkan 1,6 kali lipat lebih tinggi secara statistik dibandingkan dengan penggunaan NaCl saja. (Hartikka *J dkk*, 2000)

#### **4.5 Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)**

ELISA digunakan untuk menganalisis adanya interaksi antara antigen dengan antibodi didalam suatu sampel dengan menggunakan enzim sebagai pendeteksi (*reporter label*) (Baratawidjaja, 2009). ELISA dapat mendeteksi antibodi dengan spesifik dan dalam jumlah sampel yang banyak (Murphy *dkk*, 1984). Murphy *dkk*. (1984) sebelumnya juga telah berhasil menggunakan uji ELISA untuk mendeteksi dan menghitung titer antibodi monoklonal matriks virus influenza. ELISA dengan menggunakan peptida telah secara luas digunakan untuk uji serologis infeksi bakteri dan virus. ELISA dengan menggunakan peptida memiliki beberapa keuntungan diantaranya mudah digunakan, cepat, sensitif dan relatif murah. (Velumani *dkk*, 2011)

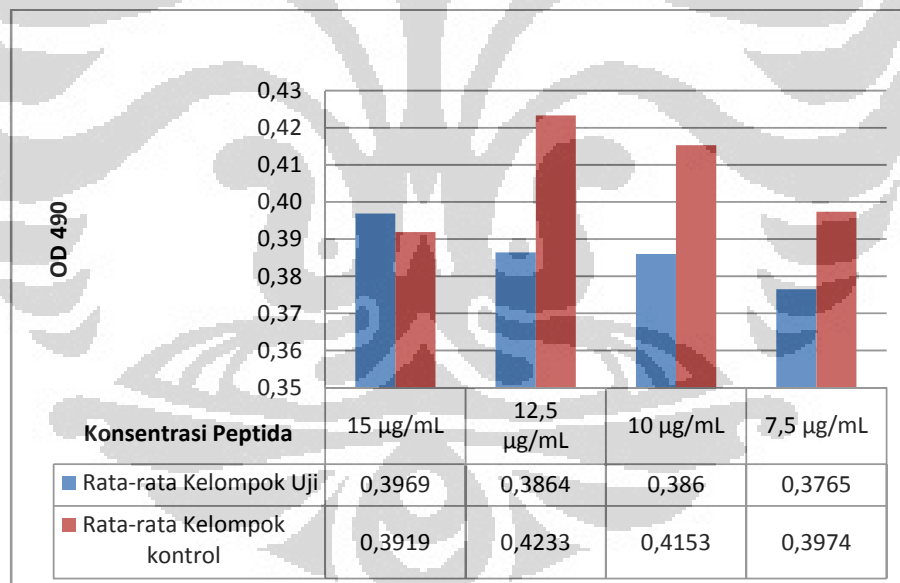
##### **4.5.1 Optimasi ELISA pendeteksi antibodi vaksin pcDNA3.1 HA, pc DNA HA-MPER-1 dengan peptida ELDKWAS**

Sebelum digunakan untuk menilai reaktivitas serum terhadap peptida ELDKWAS, kondisi uji ELISA pendeteksi antibodi harus dioptimasi terlebih dahulu dengan melakukan variasi pengenceran peptida ELDKWAS dan sampel serum berasal dari darah mencit diimunisasi vaksin pcDNA3.1 HA-MPER-1 yang

dipanen enam minggu sejak imunisasi. Penggunaan serum ini dilakukan karena pada saat optimasi kondisi ELISA belum diketahui apakah vaksin pcDNA3.1 HA-MPER-1 dapat menginduksi respons antibodi ELDKWAS.

Penentuan konsentrasi peptida dilakukan dengan pencarian literatur dengan penelitian yang sama menggunakan ELISA peptida. Berdasarkan penelitian Zhang Hangtao *dkk* (2004), konsentrasi yang digunakan untuk menganalisis vaksin VLP L1-ELDKWA adalah 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Oleh karena itu, pada penelitian ini digunakan variasi konsentrasi ELDKWAS 15; 12,5 ;10 dan 7,5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .

Berdasarkan data hasil optimasi konsentrasi peptida, digunakan konsentrasi peptida sebesar 15  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . hal ini dapat dilihat karena pada konsentrasi peptida ini didapatkan hasil kelompok uji lebih besar daripada kelompok kontrol. Sedangkan pada konsentrasi 12,5; 10 dan 7,5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  didapatkan hasil kelompok kontrol lebih tinggi dibandingkan kelompok uji. (Gambar 4.6)

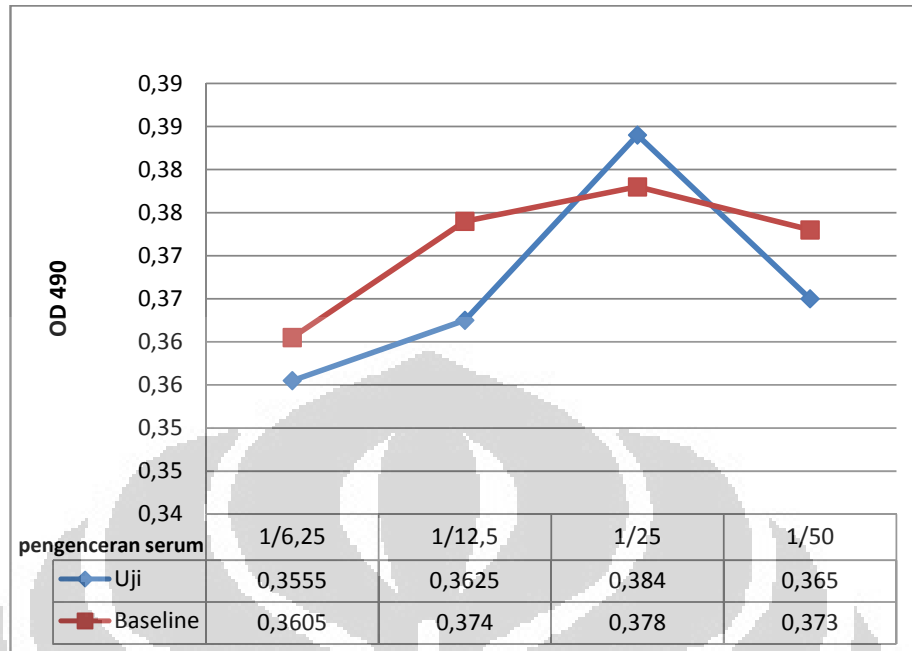


**Gambar 4.6.** Grafik hasil optimasi ELISA penentuan konsentrasi peptida ELDKWAS dari hasil optimasi ELISA dengan menggunakan variasi konsentrasi peptida 15; 12,5 ;10 dan 7,5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  dengan variasi konsentrasi serum

Sama halnya dengan penentuan konsentrasi peptida, penentuan konsentrasi serum juga diambil dari penelitian Zhang Hangtao *dkk* (2004), variasi konsentrasi

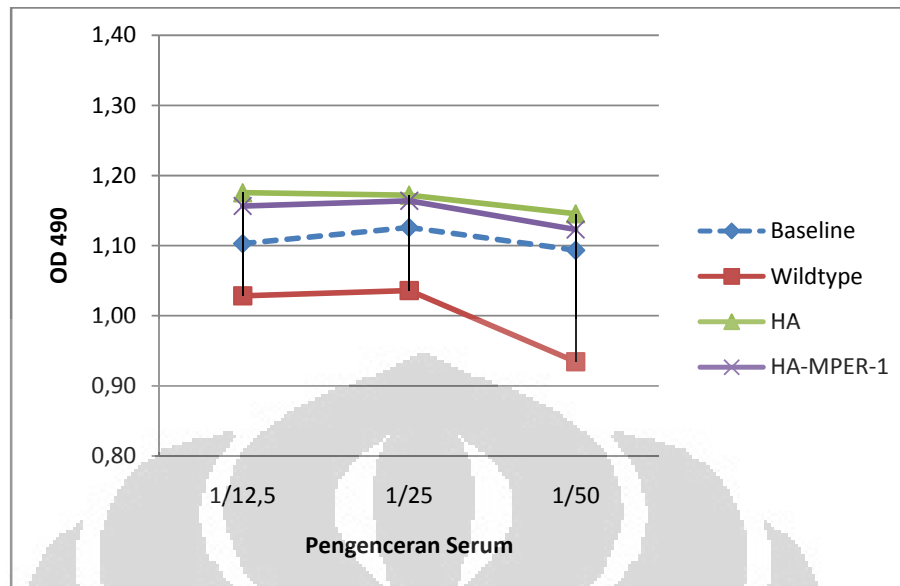
yang digunakan pada penelitian Zhang *dkk* dimulai dari pengenceran berseri 1/50, 1/100, 1/200, 1/400, 1/800 dan 1/1600. Namun pada penelitian tersebut, konsentrasi serum yang memiliki perbedaan antara kelompok uji dengan kelompok kontrol yaitu pada konsentrasi 1/50, 1/100 dan 1/200. Oleh karena itu, pada penelitian ini, menggunakan vaksin DNA, dilakukan peningkatan konsentrasi serum menjadi 1/6,25 ; 1/12,5 ; 1/25 ; 1/50. Variasi pengenceran serum mencit perlakuan dan serum mencit kontrol digunakan untuk menilai konsentrasi peptida yang mampu membedakan titer antibodi spesifik ELDKWAS pada mencit yang diimunisasi dengan vaksin pcDNA3.1 HA-MPER-1 dan mencit yang belum diimunisasi dengan vaksin DNA.

Hasil optimasi uji ELISA menunjukkan bahwa respons antibodi yang terbentuk enam minggu setelah imunisasi vaksin pcDNA3.1 HA-MPER-1 dapat terlihat lebih tinggi pada mencit perlakuan dibandingkan dengan mencit kontrol sebelum diimunisasi vaksin DNA, bila digunakan pengenceran serum 1/25. Pada konsentrasi ini, nilai absorbansi yang didapat lebih tinggi dibandingkan konsentrasi serum 1/6,25 ; 1/12,5 dan 1/50. Hal ini dapat disebabkan karena antibodi yang terdapat pada konsentrasi serum 1/6,25 dan 1/12,5 terlalu banyak sehingga mengganggu pengikatan antara antibodi pertama dengan antibodi kedua (*anti-mouse* berlabel biotin) sehingga menyebabkan nilai absorbansi turun. Grafik hasil optimasi ELISA dapat dilihat pada Gambar 4.7. Pada gambar tersebut juga dapat dilihat nilai OD pada kelompok uji menunjukkan nilai yang lebih rendah dibandingkan dengan nilai OD pada kelompok kontrol. Oleh karena itu, perlu dilakukan optimasi ulang terhadap seluruh kelompok uji, vaksin pcDNA3.1 *wildtype*, vaksin pcDNA3.1 HA, vaksin pcDNA3.1 HA-MPER-1.



**Gambar 4.7.** Grafik hasil optimasi ELISA penentuan konsentrasi serum mencit antara serum sebelum diimunisasi vaksin pcDNA3.1 HA-MPER-1 dengan serum sesudah divaksinasi *booster* ke-2 dengan menggunakan variasi konsentrasi serum 1/6,25, 1/12,5; 1/25/1/50 pada konsentrasi peptida 15 $\mu$ g/mL

Hasil uji optimasi ELISA antar kelompok perlakuan menunjukkan bahwa respons antibodi yang terbentuk enam minggu sejak imunisasi vaksin pcDNA3.1 HA-MPER-1 dapat terlihat lebih tinggi pada mencit perlakuan dibandingkan dengan mencit kelompok vaksin pcDNA3.1 *wildtype* dan kontrol sebelum diimunisasi vaksin DNA. Namun, pada kelompok vaksin pcDNA3.1 HA terlihat lebih tinggi dibandingkan dengan vaksin pcDNA3.1 HA-MPER-1. (Gambar 4.8) Hal ini dimungkinkan terjadi pengikatan antibodi nonspesifik antara peptida ELDKWAS dengan serum mencit kelompok vaksin pcDNA3.1 HA. Respons imun yang dihasilkan mencit pada vaksin pcDNA HA tersebut berupa antibodi poliklonal yang dapat berinteraksi dengan peptida ELDKWAS

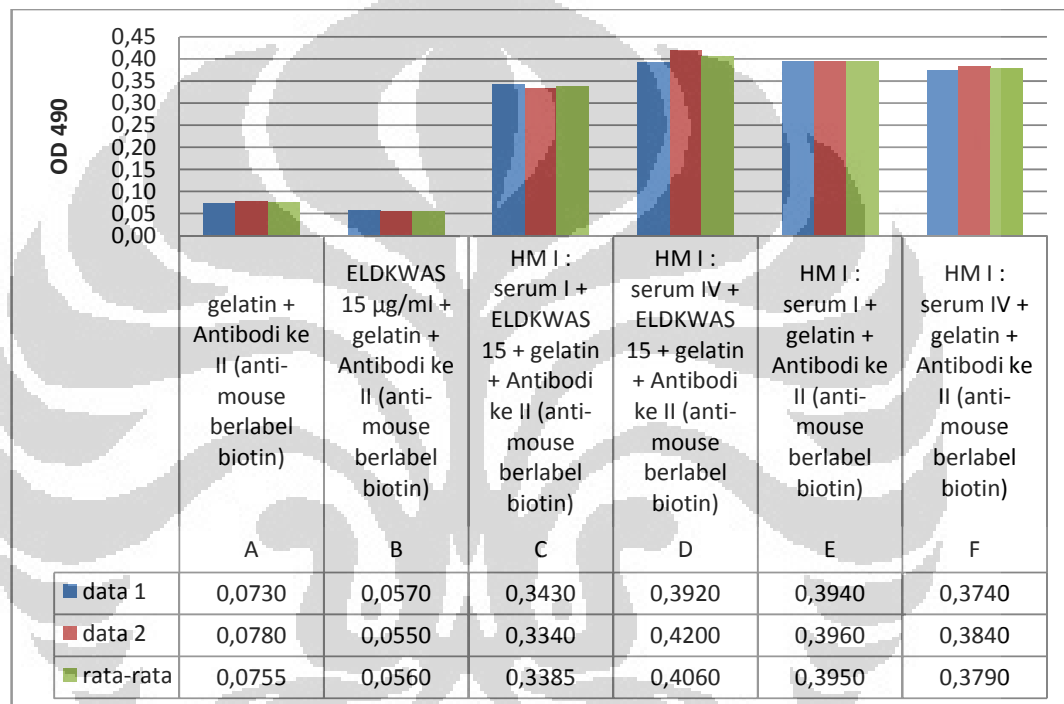


**Gambar 4.8.** Grafik hasil optimasi ELISA pada konsentrasi peptida 15 $\mu$ g/ml pada kelompok serum HA-MPER-1 sebelum diimunisasi vaksin pcDNA3.1 HA-MPER-1(baseline), kelompok serum HA-MPER-1 setelah diimunisasi vaksin pcDNA3.1 HA-MPER-1 *booster* kedua, kelompok serum HA setelah diimunisasi vaksin pcDNA3.1 HA *booster* kedua, dan kelompok vaksin pcDNA3.1 *wildtype*

Uji Optimasi ELISA dilakukan kembali terhadap peptida dengan melakukan uji terhadap sumuran yang dilapisi peptida dengan yang tidak dilapisi peptida. Hal ini dilakukan untuk mengurangi bias saat melakukan uji ELISA terhadap berbagai serum mencit dari 4 kelompok perlakuan. Selain itu, uji ini dilakukan karena terdapat hasil yang kurang konsisten terhadap optimasi sebelumnya. Uji tersebut dapat dilakukan dengan melakukan perbandingan antar kontrol yaitu, sumuran ELISA yang lapisi dengan peptida dengan sumuran ELISA yang tidak dilapisi dengan peptida. Kedua kelompok ini diberikan masing-masing tiga perlakuan. Perlakuan pertama pada sumuran baris pertama tidak diberikan serum mencit. Perlakuan kedua pada sumuran baris kedua diberikan serum pertama (serum sebelum diimunisasi). Perlakuan ketiga pada sumuran baris ketiga diberikan serum keempat (serum *booster* kedua).

Dari hasil ini dapat dilihat sumuran tanpa peptida memiliki nilai rata-rata absorbansi lebih tinggi dibandingkan serum yang dilapisi oleh peptida. (Gambar

4.9). Kesimpulan yang didapat dari hasil optimasi ini yaitu terdapat nilai absorbansi yang lebih tinggi antara gelatin dengan antibodi berlabel biotin. Oleh karena itu, perlu dilakukan optimasi ulang terhadap *dilution buffer* dengan *buffer blocking*. Konsentrasi *dilution buffer* yang dibuat untuk mengoptimasi serum darah mencit yaitu 0,1%, 1%, 1,5% dan 2%. Sedangkan konsentrasi *buffer blocking* yang digunakan untuk optimasi yaitu *blocking buffer* 1% dengan *blocking buffer* 2%.



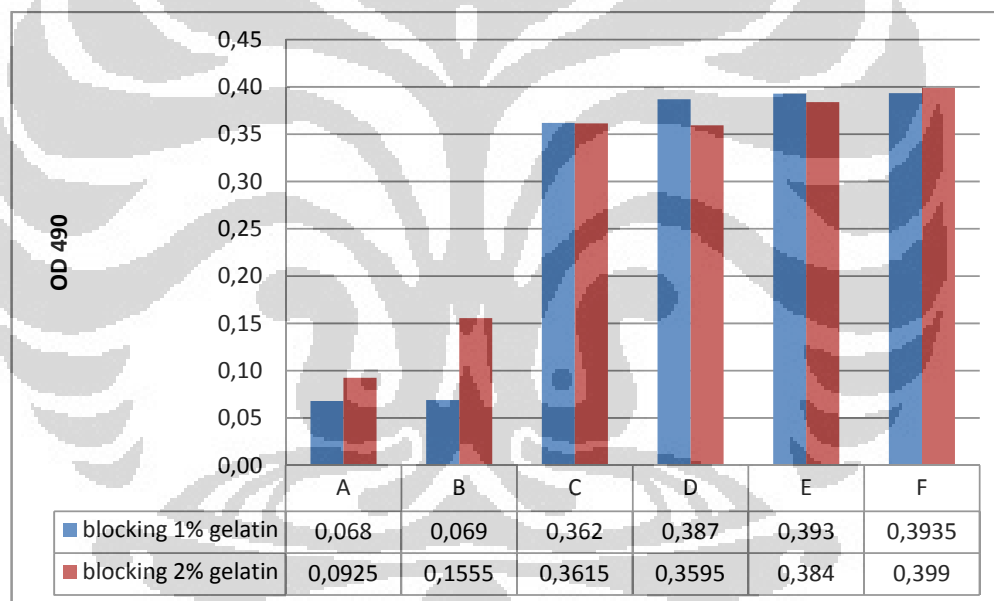
**Gambar 4.9.** Grafik hasil optimasi ELISA penentuan reaktivitas peptida terhadap beberapa kelompok perlakuan dengan atau tanpa serum mencit sebelum diimunisasi vaksin pcDNA3.1 HA-MPER-1 dengan serum sesudah divaksinasi *booster* ke-2 dengan menggunakan konsentrasi serum 1/25 pada konsentrasi peptida 15µg/mL

Uji optimasi ELISA pada variasi konsentrasi *buffer blocking* dengan *dilution buffer* dilakukan dengan tujuan untuk menentukan pada konsentrasi berapa *buffer blocking* dengan *dilution buffer* dapat mengurangi nilai absorbansi yang tinggi pada kelompok kontrol. Hal ini akan membantu mengurangi bias pada uji ELISA terhadap semua kelompok mencit. Sama halnya dengan uji reaktivitas



peptida, uji ini juga dilakukan pada sumuran yang tidak terlapisi peptida dan pada sumuran yang dilapisi peptida.

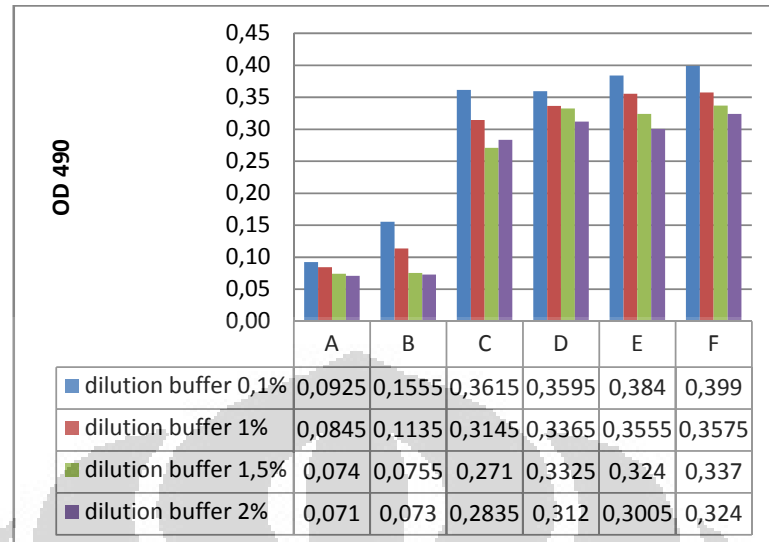
Hasil uji optimasi ELISA pada variasi konsentrasi *buffer blocking* dapat dilihat pada gambar 4.10. *Buffer blocking* yang terlihat efektif yaitu *blocking* 1% gelatin. Sedangkan *buffer blocking* 2% terlihat adanya penurunan pada kelompok vaksin pcDNA3.1HA-MPER-1. Sedangkan untuk *dilution buffer* dilihat pada gambar 4.11. terlihat konsentrasi *dilution buffer* yang paling baik yaitu 1,5%. Pada konsentrasi ini terlihat peningkatan grafik yang terlihat jauh dibandingkan kelompok *dilution buffer* lainnya. dalam kelompok sumuran yang dilapisi ELDKWAS antara serum I (pada gambar ditandai dengan huruf C) dan antara serum IV (pada gambar ditandai dengan huruf D).



Keterangan :

- A= gelatin + Antibodi II (anti-*mouse* berlabel biotin)
- B= ELDKWAS 15 µg/mL + gelatin+ Antibodi II (anti-*mouse* berlabel biotin)
- C= ELDKWAS 15 µg/mL + gelatin+ serum I + Antibodi II (anti-*mouse* berlabel biotin)
- D= ELDKWAS 15 µg/mL + gelatin+ serum IV + Antibodi II (anti-*mouse* berlabel biotin)
- E=Serum I+ gelatin+ Antibodi II (anti-*mouse* berlabel biotin)
- F= Serum I + gelatin+ Antibodi II (anti-*mouse* berlabel biotin)

**Gambar 4.10.** Grafik hasil optimasi ELISA perbandingan antar perlakuan antara *blocking buffer* 1% gelatin dengan *blocking buffer* 2%.



Keterangan :

A= gelatin + Antibodi II (anti-*mouse* berlabel biotin)

B= ELDKWAS 15 µg/mL + gelatin+ Antibodi II (anti-*mouse* berlabel biotin)

C= ELDKWAS 15 µg/mL + gelatin+ serum I + Antibodi II (anti-*mouse* berlabel biotin)

D= ELDKWAS 15 µg/mL + gelatin+ serum IV + Antibodi II (anti-*mouse* berlabel biotin)

E= Serum I+ gelatin+ Antibodi II (anti-*mouse* berlabel biotin)

F= Serum I + gelatin+ Antibodi II (anti-*mouse* berlabel biotin)

**Gambar 4.11.** Grafik hasil optimasi ELISA perbandingan antara perlakuan dengan *dilution buffer* 0,1%, 1%, 1,5% dan 2%

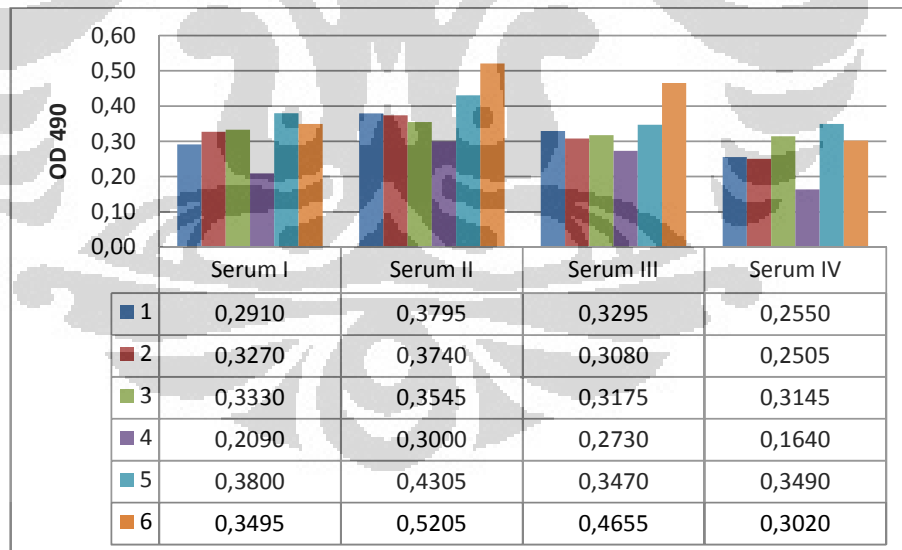
Antibodi kedua yang digunakan dalam penelitian yaitu, antibodi berlabel biotin yang mengenali Immunoglobulin G mencit. Antibodi kedua tersebut akan menempel pada antibodi sampel atau serum mencit yang sebelumnya telah menempel pada antigen, sehingga dapat terjadi interaksi antara antigen dan antibodi yang bersesuaian. Kemudian ke atas permukaan tersebut dicampurkan suatu substrat yang dapat bereaksi dengan enzim sinyal. Pada saat substrat tersebut dicampurkan ke permukaan, enzim yang berikatan dengan antibodi atau antigen spesifik yang berinteraksi dengan antibodi atau antigen sampel akan bereaksi dengan substrat dan menimbulkan suatu sinyal yang dapat dideteksi. Substrat yang digunakan dalam penelitian ini adalah substrat OPD (O-Phenylenediamine) yang dilarutkan dalam hidrogen peroksida. Sinyal yang dihasilkan berupa perubahan warna campuran dalam pelat yang sebelumnya bening menjadi berwarna kuning-orange (Ausubel *dkk*, 1990 & Kresno, 2001) Intensitas warna campuran diukur dengan spektrofotometer yang disebut ELISA

reader pada panjang gelombang 490 nm, sehingga didapatkan hasil berupa nilai OD.

#### 4.6. Respons Imun Humoral Mencit BALB/c terhadap Peptida ELDKWAS Diinduksi oleh Pemberian Vaksin DNA

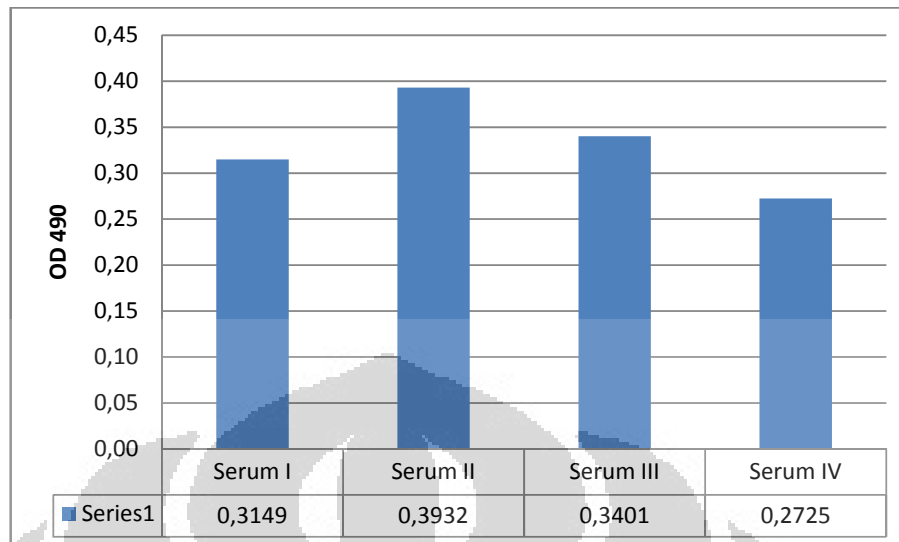
4.6.1. Sebaran reaktivitas serum mencit divaksinasi vaksin DNA pcDNA3.1 *wildtype* berdasarkan waktu pengambilan serum.

Analisis reaktivitas masing-masing serum mencit perlakuan divaksinasi pcDNA3.1 *wildtype* terhadap peptida ELDKWAS (Gambar 4.12) secara umum memperlihatkan peningkatan pada serum II (OD berkisar antara 0,3000-0,5205) yang dipanen 2 minggu sejak vaksinasi pertama. Tampak adanya penurunan reaktivitas antibodi pada serum III (OD berkisar antara 0,164-0,349) dibandingkan dengan serum I (OD berkisar antara 0,209-0,38). Sedangkan pada nilai rata-rata reaktivitas serum mencit (Gambar 4.13) terlihat penurunan dari serum II ke serum III dan serum III ke serum IV. Peningkatan hanya terjadi pada serum I dan Serum II.



Keterangan gambar 1,2,3,4,5,6 melambangkan tiap individu mencit yang termasuk kedalam kelompok pcDNA3.1 *wildtype*

**Gambar 4.12.** Grafik reaktivitas serum mencit divaksinasi vaksin DNA pcDNA3.1 *wildtype* terhadap peptida ELDKWAS



Keterangan :

Serum I : Serum yang diambil sebelum diimunisasi

Serum II: Serum yang diambil 2 minggu setelah imunisasi vaksin pertama

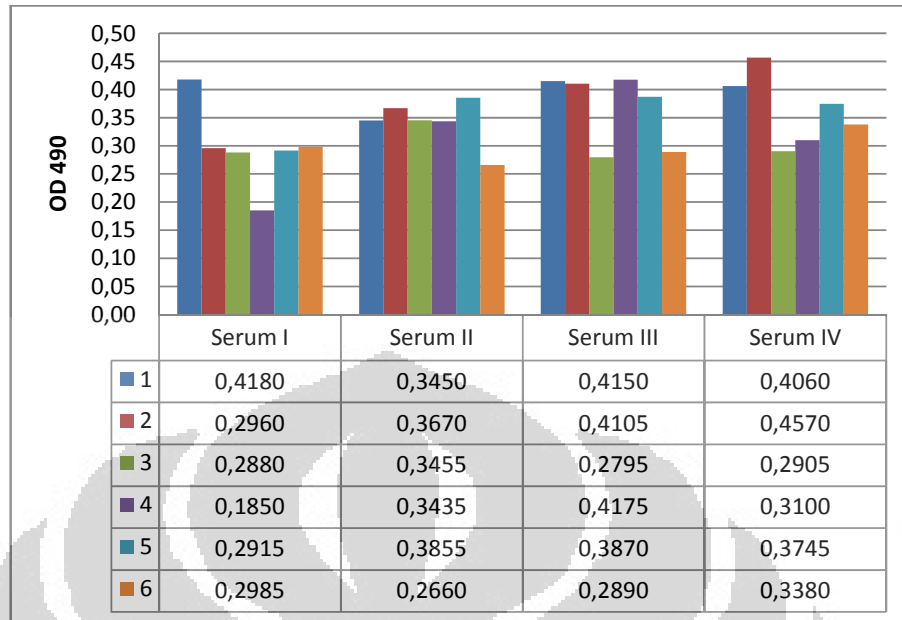
Serum III: Serum yang diambil 4 minggu setelah imunisasi vaksin pertama

Serum IV : Serum yang diambil 6 minggu setelah imunisasi vaksin pertama

**Gambar 4.13.** Grafik rata-rata reaktivitas serum mencit divaksinasi vaksin pcDNA3.1 *wildtype* terhadap peptida ELDKWAS

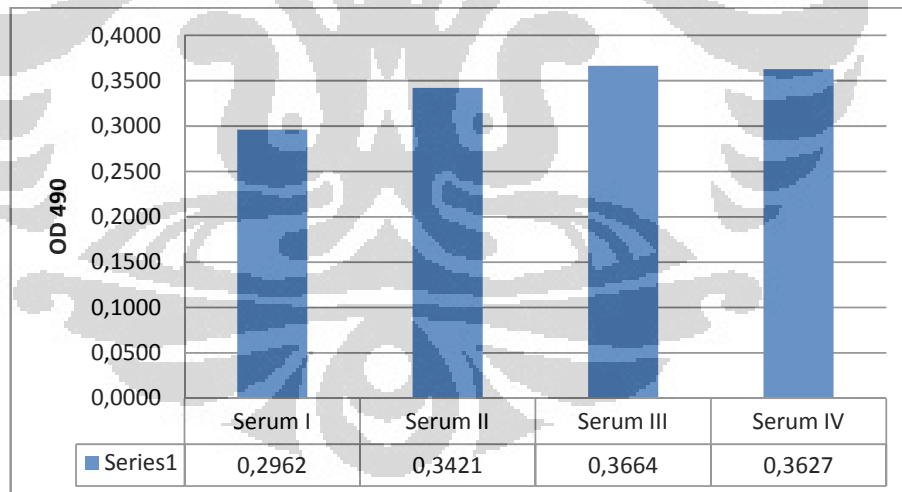
#### 4.6.2. Sebaran reaktivitas serum mencit divaksinasi vaksin DNA pcDNA3.1 HA berdasarkan waktu pengambilan serum.

Analisis reaktivitas masing-masing serum mencit perlakuan divaksinasi pcDNA3.1 HA terhadap peptida ELDKWAS (Gambar 4.14) secara umum memperlihatkan peningkatan pada serum IV (OD berkisar antara 0,27-1,06) yang dipanen 6 minggu sejak vaksinasi pertama, atau 2 minggu sejak vaksinasi *booster* kedua. Tampak tidak ada penurunan reaktivitas antibodi pada semua kelompok serum dibandingkan dengan serum I (OD berkisar antara (0,185-0,418)). Sedangkan pada nilai rata-rata reaktivitas serum mencit pcDNA3.1 HA (Gambar 4.15) terlihat peningkatan dari serum I ke serum II dan serum II ke serum III. Penurunan hanya terjadi pada serum III dan Serum IV.



Keterangan gambar 1,2,3,4,5,6 melambangkan tiap individu mencit yang termasuk kedalam kelompok pcDNA3.1 HA

**Gambar 4.14.** Grafik reaktivitas serum mencit divaksinasi vaksin DNA pcDNA3.1 HA terhadap peptida ELDKWAS



Keterangan :

Serum I : Serum yang diambil sebelum diimunisasi

Serum II: Serum yang diambil 2 minggu setelah imunisasi vaksin pertama

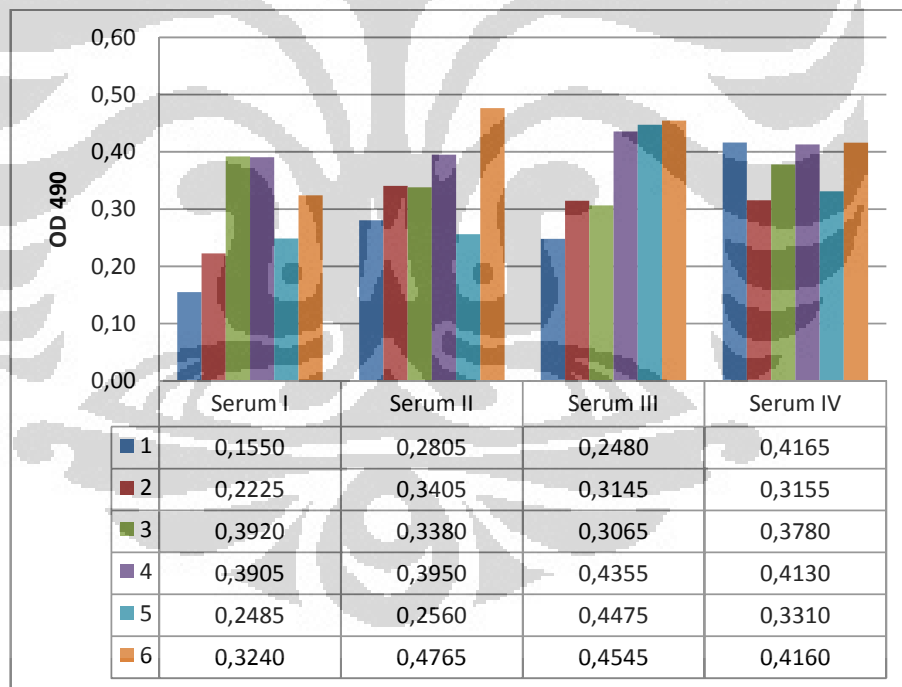
Serum III: Serum yang diambil 4 minggu setelah imunisasi vaksin pertama

Serum IV : Serum yang diambil 6 minggu setelah imunisasi vaksin pertama

**Gambar 4.15.** Grafik rata-rata reaktivitas serum mencit divaksinasi vaksin DNA pcDNA3.1 HA terhadap peptida ELDKWAS

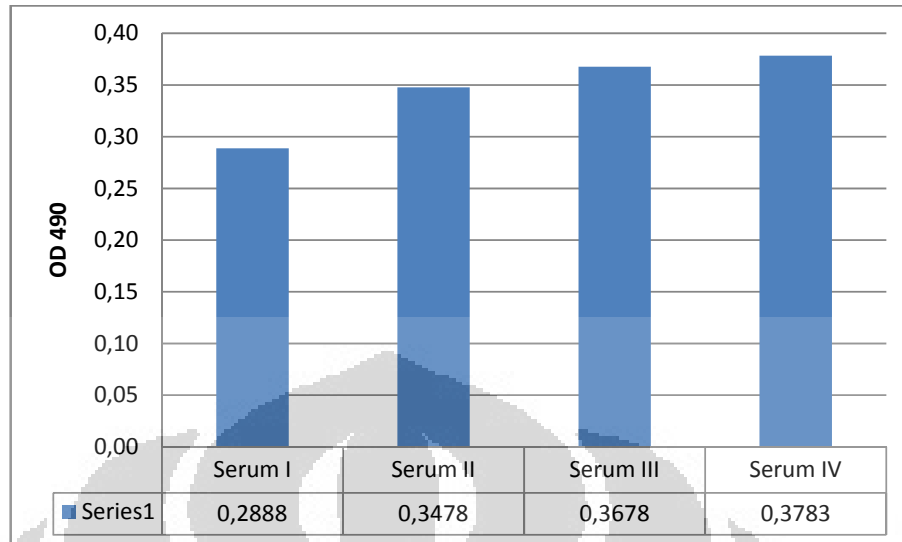
#### 4.6.3. Sebaran reaktivitas serum mencit divaksinasi vaksin DNA pcDNA3.1 HA-MPER-1 berdasarkan waktu pengambilan serum.

Analisis reaktivitas masing-masing serum mencit perlakuan divaksinasi pcDNA3.1HA-MPER-1 terhadap peptida ELDKWAS (Gambar 4.16) secara umum memperlihatkan peningkatan pada serum II (OD berkisar antara 0,256-0,4765) yang dipanen 2 minggu sejak vaksinasi pertama, atau 2 minggu sejak vaksinasi pertama, serum IV (OD berkisar antara 0,3155-0,4165) terhadap serum I (OD berkisar 0,155-0,392). Tampak adanya penurunan reaktivitas antibodi pada serum III (OD berkisar antara 0,248-0,4545) yang dipanen 4 minggu sejak vaksinasi pertama, atau 2 minggu sejak vaksinasi *booster* pertama dibandingkan dengan serum II (OD berkisar antara (0,256-0,256). Pada nilai rata-rata reaktivitas serum mencit (Gambar 4.17) terlihat peningkatan grafik dari serum I ke serum II, serum II ke serum III dan serum III ke serum IV.



Keterangan gambar 1,2,3,4,5,6 melambangkan tiap individu mencit yang termasuk kedalam kelompok pcDNA3.1 HA

**Gambar 4.16.** Grafik reaktivitas serum mencit divaksinasi vaksin DNA pcDNA3.1 HA-MPER-1 terhadap peptida ELDKWAS



Keterangan :

Serum I : Serum yang diambil sebelum diimunisasi

Serum II: Serum yang diambil 2 minggu setelah imunisasi vaksin pertama

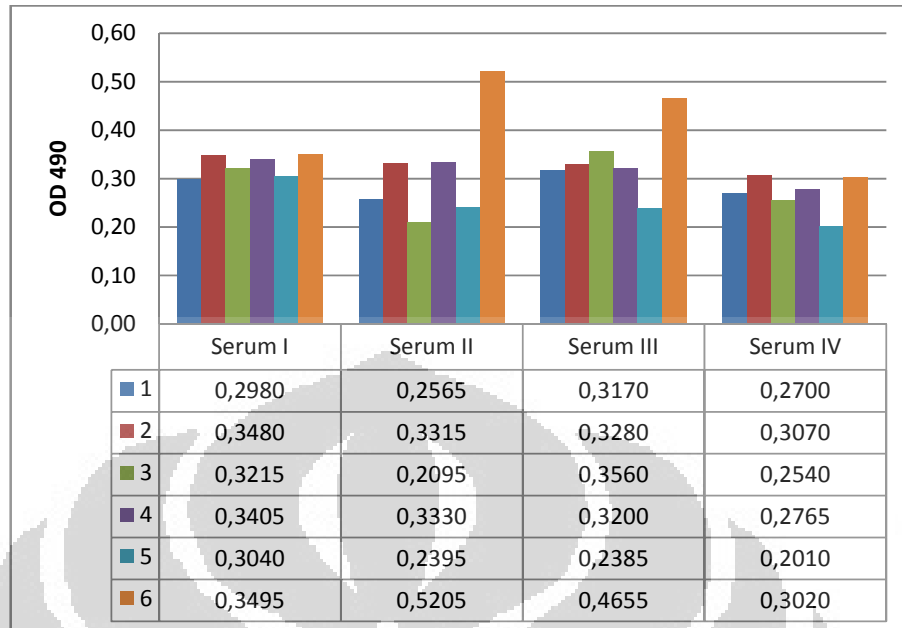
Serum III: Serum yang diambil 4 minggu setelah imunisasi vaksin pertama

Serum IV : Serum yang diambil 6 minggu setelah imunisasi vaksin pertama

**Gambar 4.17.** Grafik rata-rata reaktivitas serum mencit divaksinasi vaksin DNA pcDNA3.1 HA-MPER-1 terhadap peptida ELDKWAS

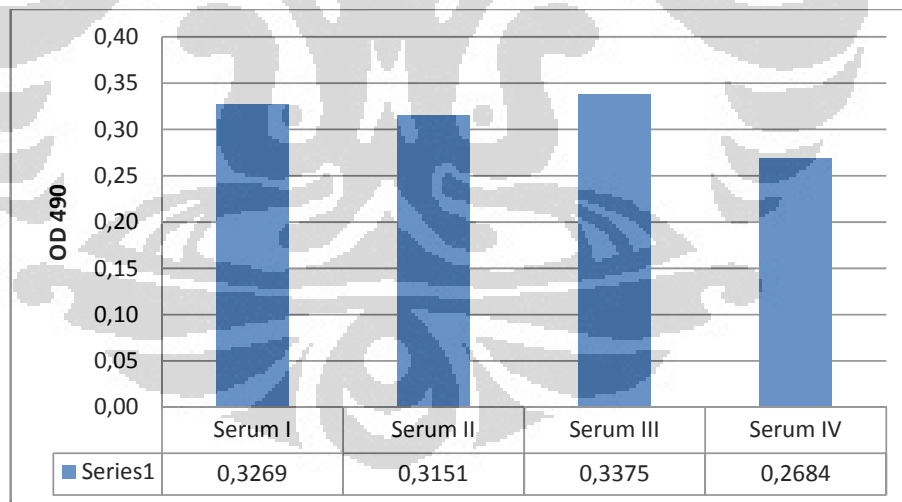
#### 4.6.4. Sebaran reaktivitas serum mencit divaksinasi vaksin DNA pcDNA3.1 HA-MPER-2 berdasarkan waktu pengambilan serum.

Analisis reaktivitas masing-masing serum mencit perlakuan divaksinasi pcDNA3.1 HA-MPER-2 terhadap peptida ELDKWAS (Gambar 4.18) secara umum memperlihatkan penurunan pada serum IV (OD berkisar antara 0,201-0,307) yang dipanen 6 minggu sejak vaksinasi pertama, atau 2 minggu sejak vaksinasi *booster* kedua. Tampak adanya fluktuasi antar grafik peningkatan reaktivitas antibodi antara serum I (OD berkisar antara 0,298-0,3495), serum II (OD berkisar antara 0,2095-0,5205), serum III (OD berkisar antara 0,385-0,4655) serta serum IV (OD berkisar antara 0,201-0,307). Pada nilai rata-rata reaktivitas serum mencit (Gambar 4.19) terlihat fluktuatif. Pada gambar 4.19 terlihat penurunan grafik dari serum I ke serum II. Lalu, diikuti dengan peningkatan grafik dari serum II ke serum III. Dan terakhir, terjadi penurunan grafik dari serum III ke serum IV.



Keterangan gambar 1,2,3,4,5,6 melambangkan tiap individu mencit yang termasuk kedalam kelompok pcDNA3.1 HA

**Gambar 4.18.** Reaktivitas serum mencit divaksinasi vaksin DNA pcDNA3.1 HA-MPER-2 terhadap peptida ELDKWAS



Keterangan :

Serum I : Serum yang diambil sebelum diimunisasi

Serum II: Serum yang diambil 2 minggu setelah imunisasi vaksin pertama

Serum III: Serum yang diambil 4 minggu setelah imunisasi vaksin pertama

Serum IV : Serum yang diambil 6 minggu setelah imunisasi vaksin pertama

**Gambar 4.19.** Reaktivitas serum mencit divaksinasi vaksin DNA pcDNA3.1 HA-MPER-2 terhadap peptida ELDKWAS

Universitas Indonesia



#### 4.7. Analisis Respons Humoral Mencit BALB/c terhadap Peptida ELDKWAS yang Dihasilkan oleh Vaksin DNA

Beberapa kelompok mencit perlakuan pcDNA3.1 HA, dan pcDNA HA-MPER-1 menunjukkan peningkatan respons antibodi spesifik pada perbandingan respons antibodi spesifik ELDKWAS antara serum I dan II, I dengan III, I dengan IV. Namun, peningkatan reaktivitas ini harus diuji dengan uji statistik yang menunjukkan hubungan waktu pengambilan serum dengan reaktivitas serum pada mencit divaksinasi vaksin DNA.

Nilai OD pada kelompok kontrol terlihat lebih rendah secara signifikan terhadap kelompok perlakuan pada hasil analisis reaktivitas serum antara kelompok perlakuan dengan kelompok kontrol (kelompok pcDNA3.1 *Wildtype* dengan pcDNA3.1 HA dan kelompok pcDNA3.1 *wildtype* dengan pcDNA HA-MPER-1). Kelompok serum IV dinilai dengan uji ANOVA (data terdistribusi normal,  $> 0,050$ ) terlihat signifikan  $p=0,002$ . Untuk melihat adanya perbedaan antar kelompok dilakukan uji Post Hoc dengan menggunakan uji Tukey HSD dan uji LSD. Terlihat perbedaan yang cukup signifikan pada kelompok pcDNA3.1 *wildtype* dengan kelompok pcDNA3.1 HA pada uji Tukey HSD ( $p= 0,041$ ) dan uji LSD ( $p= 0,009$ ). Sedangkan perbedaan yang cukup signifikan dapat terlihat juga pada kelompok pcDNA3.1 *wildtype* dengan kelompok pcDNA3.1 HA-MPER-1 pada uji Tukey HSD ( $p=0,014$ ) dan uji LSD ( $p= 0,003$ ). Pada kelompok serum IV juga dapat dilihat perbedaan yang cukup signifikan antara pcDNA3.1 HA dengan pcDNA3.1 HA-MPER-2 pada uji Tukey HSD ( $p= 0,031$ ) dan uji LSD ( $p=0,007$ ). Perbedaan yang cukup signifikan juga dapat dilihat antara pcDNA3.1 HA-MPER-1 dengan pcDNA3.1 HA-MPER-2 pada uji Tukey HSD ( $p=0,010$ ) dan pada uji LSD ( $p= 0,002$ ).

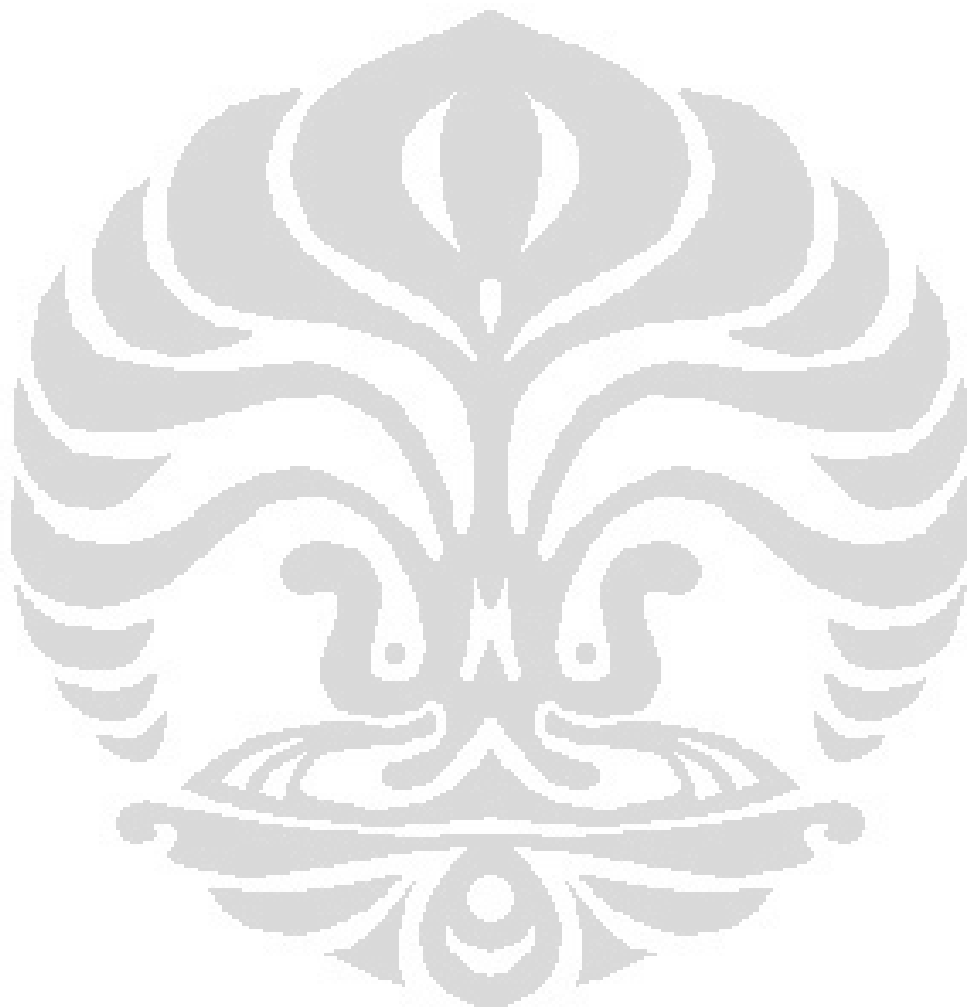
Vaksin pcDNA3.1 HA menimbulkan respons antibodi yang lebih tinggi dibandingkan dengan respons antibodi pada pcDNA3.1 HA-MPER-1, namun hal ini tidak menunjukkan peningkatan yang signifikan. Hal ini dapat dilihat pada nilai signifikansi antara kelompok pcDNA3.1 HA dengan kelompok pcDNA3.1 HA-MPER-1 baik pada serum ketiga ( $p=0,684$ ) maupun pada serum keempat ( $p=0,65$ ). Respons antibodi yang kuat oleh hewan coba divaksinasi vaksin DNA

pengekspresi hemagglutinin terikat pada membrane sel pernah diobservasi sebelumnya dalam penelitian yang dilakukan oleh Budiman Bela yang membandingkan respons antibodi terhadap antigen hemagglutinin H5N1 berikatan pada membrane sel dengan antigen hemagglutinin yang tersekresi dari sel (Bela B, 2011). Respons antibodi yang kuat terhadap hemagglutinin terikat pada membrane sel diperkirakan disebabkan oleh sel dendritik yang mengekspresikan antigen vaksin DNA bermigrasi sebagai APC (antigen presenting cell) kedalam kelenjar limfe dan berinteraksi dengan sel T-CD4 sehingga menghasilkan stimulasi sel B spesifik terhadap antigen hemagglutinin. (Bela B, 2011)

Vaksin DNA yang memiliki epitop ELDKWAS yang dilakukan dalam penelitian ini tidak menghasilkan stimulasi respons antibodi ELDKWAS yang lebih tinggi dibandingkan vaksin pcDNA3.1 HA. Ada beberapa kemungkinan yang dapat menjelaskan stimulasi respons imun yang relatif tinggi pada vaksin pcDNA3.1HA terhadap peptida ELDKWAS. Hal ini dikaitkan dengan spesifitas antigen-antibodi yang dijelaskan dalam buku *Immunology and Evolution of Infectious Disease*. Terdapat beberapa aspek mengenai spesifitas antigen-antibodi. Pertama, antibodi yang dihasilkan oleh vaksin tersebut memiliki 2 daerah pengikatan bebas pada epitop yang tidak berhubungan (*unrelated epitop*). Kedua, antibodi itu sendiri memiliki banyak paratop *overlapping* yang dapat secara potensial berikatan dengan jenis epitop baik yang berhubungan (*related epitop*) maupun tidak berhubungan (*unrelated epitop*). Ketiga, Paratop tunggal dapat berikatan dengan dua epitop yang tidak berhubungan. Keempat, epitop tertentu dapat dikenali oleh 2 paratop yang berbeda dengan perbedaan sekuens. (Frank S.A,2002) Sehingga pada antibodi yang dihasilkan dari vaksin pcDNA3.1 HA dapat berikatan dengan peptida ELDKWAS.

Hasil penelitian ini memberikan informasi penting untuk dipertimbangkan dalam perancangan formulasi dan cara pemberian vaksin DNA yang diharapkan secara bersama menginduksi respons antibodi spesifik. perbedaan dalam waktu pemberian, serta konsentrasi setiap jenis vaksin DNA virus merupakan aspek yang penting untuk diteliti lebih lanjut untuk mendapatkan komposisi maupun cara pemberian vaksin DNA yang lebih efektif. Selain itu, sistem pendeteksian titer

antibodi dengan menggunakan metode ELISA perlu dikaji lebih lanjut untuk menilai respons antibodi yang lebih akurat.



## BAB 5 KESIMPULAN DAN SARAN

### 5.1 Kesimpulan

Kesimpulan dari penelitian ini :

1. Respon antibodi spesifik tidak ada pada mencit BALB/c yang diimunisasi vaksin DNA HA-MPER-1
2. Preparasi plasmid vaksin pcDNA3.1 HA-MPER-1 dan plasmid vaksin pcDNA3.1 HA didapatkan dalam bentuk murni yaitu memiliki nilai absorbansi pada kisaran 1,7-2.
3. Serum Mencit BALB/c betina didapatkan dari kelompok vaksin pcDNA 3.1 *wildtype*, vaksin pcDNA3.1 HA, vaksin pcDNA3.1 HA-MPER-1 dan vaksin pcDNA3.1 HA-MPER-2
4. Pada uji ELISA ditunjukkan adanya perbedaan secara signifikan titer antibodi antara vaksin pcDNA3.1 HA-MPER-1 dengan pcDNA3.1 *wildtype* pada serum ke empat (enam minggu setelah imunisasi vaksin pertama atau dua minggu setelah imunisasi vaksin *booster* ke dua). Selain itu, Pada uji ELISA ditunjukkan adanya perbedaan secara signifikan titer antibodi antara vaksin pcDNA3.1 HA dengan pcDNA3.1 *wildtype* pada serum ke empat (enam minggu setelah imunisasi vaksin pertama atau dua minggu setelah imunisasi vaksin *booster* ke dua).

### 5.2 Saran

1. Perlu dilakukan analisis lebih lanjut terhadap antibodi yang terbentuk dengan menggunakan uji serologis Western Blot.
2. Perlu dilakukan uji homologi protein yang terbentuk dari vaksin pcDNA3.1 HA dengan peptide ELDKWAS
3. Uji ELISA dengan menggunakan antigen HA dan gp41 perlu dilakukan untuk melihat respons antibodi vaksin pcDNA3.1 HA-MPER-1 dengan antigen HA serta vaksin pcDNA3.1 HA-MPER-1 dengan antigen gp41.

## DAFTAR ACUAN

- Alam, S.M., *dkk.* (2007). The Role of Antibodi Polyspecificity and Lipid Reactivity in Binding of Broadly Neutralizing Anti-HIV-1 Selubunge Human Monoclonal Antibodies 2F5 and 4E10 to Glycoprotein 41 Membran Proximal Selubunge Epitopes. *Journal Immunology*, 178(7): 4424-4435
- Agustian, A. (2011). Konstruksi plasmid pengkode protein hemaglutinin H5N1 dengan sisipan epitop netralisasi HIV-1 daerah MPER gp41 sebagai kandidat vaksin DNA HIV-1 [Thesis]. Jakarta : Universitas Indonesia.
- Ausubel, F.M., *dkk.* (1990). Current Protocols in Molecular Biology. Volume 1. New York : John Willey & Sons, Inc.
- Ausubel, F.M., *dkk.* (2002). Current Protocols in Molecular Biology. Volume 1. New York : John Willey & Sons, Inc.
- Baratawidjaja, K.R., & Rengganis, I. (2009). *Imunologi Dasar* (Ed. Ke-8). Jakarta : Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia
- Bela B. (2011). Pengembangan vaksin DNA influenza A H5N1: konstruksi plasmid vaksin DNA dan respons antibodi spesifik hemaglutinin mencit BALB/c terhadap vaksin DNA hemaglutinin dengan variasi penambahan DNA pengeksresi neuraminidase dan matriks [disertasi]. Jakarta: Universitas Indonesia
- Bjornssti, M. & N. Osheroff. (2001). DNA topoisomerase protocols: Enzymology and drugs. New Jersey : Humana Press, Inc.
- Burges, Graham W(ed).(1995). *Teknologi Elisa dalam Diagnosis dan Penelitian* (Wayan T. Artama, Penerjemah). Yogyakarta: Gadjah Mada University Press.
- Burke, Donald S.(1997). Recombination in HIV: An Important Viral Evolutionary Straregy. *Emerging Infectious Diseases*.Vol.3 No.3.
- Burton, Dennis R. (1997). A Vaccine for HIV tipe 1: The Antibodi Perspective. Review. National Academy of Science, Vol.94, 10018-10023
- Campbell, Neil, A., Jane B. Reece dan Lawrence G. Mitchell.(2002). *Biologi* (ed. Ke 5) (jilid 1)(Wasmen Manulu, Penerjemah). Jakarta : Erlangga.
- Campbell, Neil, A., Jane B. Reece dan Lawrence G. Mitchell.(2004). *Biologi* (ed. Ke 5) (jilid 3)(Wasmen Manulu, Penerjemah). Jakarta : Erlangga.
- Cohen, Myron S. *dkk.* (2011). Prevention of HIV-1 Infection with Early Antiretroviral Therapy. *The New England Journal of Medicine*. Vol. 365 No.6.
- Departemen Pertanian Badan Karantina Pertanian .(2009). *Pedoman Diagnosis OPTK Golongan Virus*. Jakarta : Departemen Pertanian.

- Departement of Health and Human Services National Institute of Health. (2009). *Biology of HIV*. 28 April 2009.  
<http://www.niaid.nih.gov/topics/HIVAIDS/Understanding/Biology/Pages/biology.aspx>.
- Donnelly, John J., Britta Wahren., and Margaret A.Liu. (2005). DNA Vaccines : Progress and Challenges. *Journal of Immunology*. Vol 175: 633-639.
- Fatchiyah., Estri Laras Arumingtyas., Sri Widyarti., dan Sri Rahayu. (2011). *Biologi Molekular Prinsip Dasar Analisis*. Jakarta : Erlangga
- Felgner, Jiin H., Raj Kumar., C.N Sridhar., Carl J Wheeler., Yali J.T et al. (1993). Enhanced Gene Delivery and Mechanism Studies with a Novel Series of Cationic Lipid Formulation. *Journal of Biological chemistry* 269(4): 2550-2561.
- Fields B. (2007). *Fields Virology*, 5<sup>th</sup> ed. Philadelphia: Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins.
- Frank, Steven A .(2002). *Immunology and Evolution of Infectious Disease*. United Kingdom : Princeton University Press.
- Freed, Eric O., dan Andrew J Mouland.(2006). The Cell Biology of HIV-1 and other retroviruses. *Retrovirology Review*, Vol 3:77 p 1
- Gabuzda, Dana H., Andrew Lever., Ernest Terwillinger., dan Joseph Sodroski.(1992). Effect of Deletion in Cytoplasmic Domain in Biological Function of Human Immunodeficiency Virus Tipe 1 Selubunge Glycoprotein. *Journal of Virology*, Vol. 66, No.6: 3306-3315
- Girard M, Osmanov S, Kieny M. (2006). A Review of Vaccine Research and Development: The human immunodeficiency virus (HIV). *Vaccine*, May; 24(19): 4062-81
- Girard, Marc P., Osmanov S., Olga M. Assossou., Marie-Paule Kieny.(2011). Human Immunodeficiency Virus (HIV) Immunopathogenesis and Vaccine Development : A Review. *Elsevier, Vaccine* 29, 6191-6218.
- Han, Thomas K dan My Lien Dao. (2007). Enhancement of Salivary IgA response to DNA Vaccine against *Streptococcus mutans* wall-associated protein A in mice by plasmid-based adjuvants. *Journal of Medical Microbiology*, 56, 675-680.
- Hartikka, J., V. Bozoukouva., D Jones., R Mahajan., MK Wloch *et al.* (2000). Sodium Phosphate enhances plasmid DNA expression in vivo. *Gene Therapy* 7: 1171-1182.
- Hedesteam, Gunilla B. Karlsson *et al.*(2008). The Challenges of Eliciting Neutralizing Antibodies to HIV-1 and to Influenza Virus. *Nature Review Microbiology* Vol 6: 143-155.

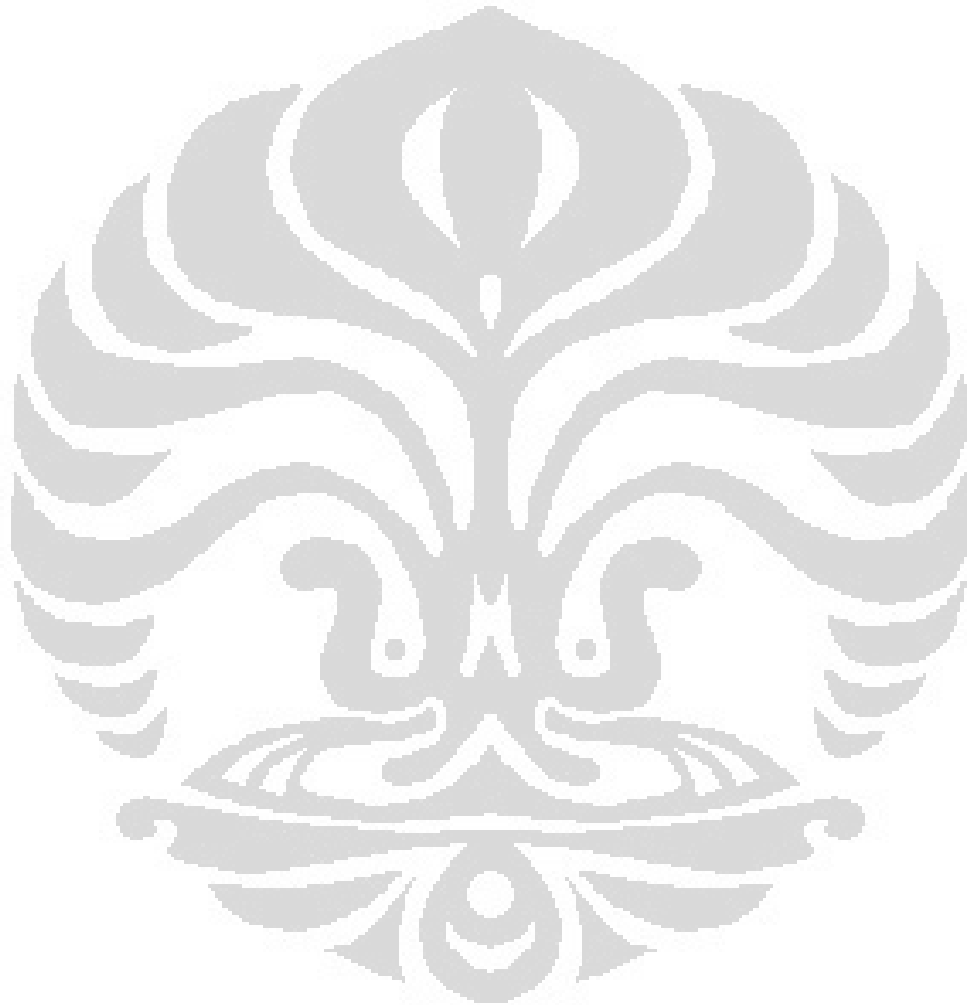
- Invitrogen. (2010). User Manual pcDNA 3.1(+) pcDNA 3.1 (-).Invitrogen Corporation
- Ji Wang, *et al.* (2011). HIV-1 gp41 core with Exposed Membrane-Proximal External Region Inducing Broad HIV-1 Neutralizing Antibodies. *Plos One*, Vol 6. Issue 3
- Korber, B., B. Gaschen, K. Yusim, R. Thakallapally, C. Kesmir, & V. Detours. (2001). Evolutionary and Immunological implications of contemporary HIV-1 variation. *British Medical Bulletin* (58) : 19-24
- Kresno, Siti Boedina.(2001). *Imunologi: Diagnosis dan Prosedur Laboratorium*. Jakarta: Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia.
- Kementrian Kesehatan Republik Indonesia Direktorat Jendral Pengendalian Penyakit dan Penyehatan Lingkungan.(2011). *Laporan Kasus HIV-AIDS di Indonesia Triwulan 3, tahun 2011*. Jakarta : Kementerian Kesehatan Republik Indonesia.
- Komisi Penanggulangan AIDS. (2007). *Strategi Nasional Penanggulangan HIV dan AIDS 2007-2010*. Jakarta : Komisi Penanggulangan AIDS.
- Kumar V, Abbas AK, Fausto N. (2005). *Pathologic Basis of Disease*. Elsevier Saunders
- Ling Ye.,*et al.*(2011). Induction of HIV Neutralizing Antibodies against the MPER of the HIV Selubunge Protein by HA/gp41 Chimeric Protein-Based DNA and VLP Vaccine. *PloS One* 6(5) e 14813.
- Margalith, Michal and Adrian Vilalta. (2006). Sustained protective rabies neutralizing antibody titer after administration of cationic lipid-formulated pDNA vaccine. *Gene vaccines and therapy* 4:2
- Montero, Marinieve., Nienke E. van Houten., Xin Wang., Jamie K. Scott.(2008). The Membran-Proximal External Region of the Human Immunodeficiency Virus Tipe 1 Selubunge : Dominant Site of Antibodi Neutralization and Target for Vaccine Design. *Microbiology and Molecular Biology Review*, Vol.72 No.1, 54-84.
- Montgomery, Donna L., Jeffrey B. Ulmer., John J. Donnelly., dan Margaret A. Liu.(1997). DNA Vaccine. *Pharmacology Therapy*. Vol. 74, No.2, 195-205.
- Murphy, B.R., L.J. Reck, K.L. Wyke & J.W. Yewdell. (1984). Antigenic characterization of influenza A virus matrix protein with monoclonal antibodies. *Journal of Virology* 49(1): 248-252
- Muster T, Guinea R, Trkola A, Purtscher M, Klima A, Steindl F, *et al.* Cross-neutralizing activity against divergent human immunodeficiency virus type 1 isolates induced by gp41 sequence ELDKWAS. *J.Virol*;68(6): 4031-4
- Muster, dkk. (1993). A Conserved Neutralizing Epitope on gp41 of human immunodeficiency virus type 1. *J. Virol.* 67 (11): 6642-7

- Nelson, Josh D. et al. (2007). An Affinity-Enhanced Neutralizing Antibody against the Membrane-Proximal External Region of Human Immunodeficiency Virus Type 1 gp41 Recognizes an Epitope between Those of 2F5 and 4E10. *Journal of Virology*, Vol. 81, No. 8, 4033-4043.
- ODHA Indonesia. (2007). *Siklus Hidup HIV*. 3 Maret 2007. <http://www.odhaindonesia.org/content/2007/03/03/siklus-hidup-hiv>
- Old, R.W., dan S.B. Primrose. (1989). *Prinsip-Prinsip Manipulasi Gen* (Ed. Ke-4). Jakarta : Universitas Indonesia Press.
- Open WetWare.(2012). *E.Coli Top 10*. 23 January 2012. [http://openwetware.org/wiki/E.\\_coli\\_genotypes#Top10F.27\\_.28In\\_vitrogen.29](http://openwetware.org/wiki/E._coli_genotypes#Top10F.27_.28In_vitrogen.29)
- Peachman KK, Wiczerek L, Polonis VR, Alving CR, Rao M. (2010). The effect of sCD4 on the binding and accessibility of HIV-1 gp41 MPER epitopes to human monoclonal antibodies. *Virology*.; 428(2); 213-23
- Plotkin, Stanley A. (2008). Correlates of Vaccine-Induced Immunity. *Clinical Infectious Disease*, Vol.47 : 401-9
- Poignard, Pascal et al.(1999). *Neutralizing Antibodies Have Limited Effect on Control of Established HIV-1 Infection In Vivo*. Cell Press. Immunity, Vol 10, 431-438.
- Price S.A dan Lorraine M.W. (2006). *Patofisiologi : Konsep Klinis Proses-Proses Penyakit Edisi 6 Volume 1*. Jakarta Penerbit Buku Kedokteran EGC
- Qiagen. (2006). *QIAprep Miniprep Handbook Second Edition*. Desember 2006. Singapura : QIAgen Distributor
- Radji, Maksum. (2010). *Imunologi & Virologi*. Jakarta : PT. ISFI Penerbitan
- Radji, Maksum. (2011). *Rekayasa Genetika*. Jakarta : Sagung Seto.
- Sabri, Luknis dan Sutanto Priyo Hastono. (2010). *Statistik Kesehatan*. Jakarta : Rajawali Pers
- Sahbandar IN, dkk. (2009). Current HIV type 1 Molecular Epidemiology profile and identification of unique recombinant forms in Jakarta, Indonesia. *AIDS Res.Hum. Retroviruses*. Jul;25(7):637-46
- Sahni, Lt.Col A., dan Col A Nagendra.(2004). *HIV Vaccine Strategies-an Update*. MJAFI, Vol. 60, No.2
- Salzwedel,Karl., John T. West., dan Eric Hunter.(1999). A Conserved Tryptophan-Rich Motif in the Membrane-Proximal Region of the Human Immunodeficiency Virus Type 1 gp41 Ectodomain Is Important for Env-Mediated Fusion and Virus Infectivity. *Journal of Virology*, Vol. 73, No. 3, 2469-2480



- Scheppler, J. A., P. E. Cassin & R. M. Gambier. (2000). *Biotechnology exploration: Applying the fundamentals*. Washington, DC : ASM Press.
- Sherwood, Lauralee. (2001). *Fisiologi Manusia: dari Sel ke Sistem* (Ed. Ke-2)(Braham U Pedit, Penerjemah). Jakarta : Penerbit Buku Kedokteran EGC.
- Srivastava, Indresh K., Jeffrey B. Ulmer., dan Susan W. Barnett. (2005). Role of Neutralizing Antibodies in Protective Immunity Against HIV. *Human Vaccines* 1 :2, 45-60.
- Sudoyo, Aru W., Bambang Setyohadi., Idrus Alwi., Marcellus Simadibrata K., Siti Setiati.(2006). *Buku Ajar Ilmu Penyakit Dalam*. Jakarta : Pusat Penerbitan Ilmu Penyakit Dalam Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia.
- Talaro K.P. (2008). HIV Infection and AIDS. Dalam: *Foundations in Microbiology* 6<sup>th</sup> ed. New York: Mc Graw Hill
- TC, Friedrich., dan Watkins.(2008). Wanted: correlates of vaccine-induced protection against simian immunodeficiency virus. *Curr Opin HIV AIDS*. Vol.3(3) ; 393-8
- Velumani, S., Hui-Ting Ho., Fang HE.,Syed Musthaq., Mookkan Prabakaran., Jimmy Kwang. (2011). A novel Peptida ELISA for Universal Detection of Antibodies to human H5N1 influenza Viruses. *PLoS ONE* 6(6): e20737.
- Walter T.F. (1963). *Experimental design: theory and Application*. New York: The Macmillan Company., 19
- Watson, James D., John Tooze., David T. Kurtz. (1988). *DNA Rekombinan : Suatu Pelajaran Singkat* (Wisnu Gunarso, Penerjemah). Jakarta : Erlangga.
- World Health Organization. (2011). *HIV/AIDS*.  
<http://www.who.int/immunization/topics/hiv/en/index1.html#>
- Wolff, Jon A., et al.(1992). Expression of Naked Plasmid by Cultured Myotubes and Entry of Plasmid into T tubules and Caveolae of mammalian skeletal muscle. *Journal of Cell Science* 103, 1249-1259.
- Zhang, Hongtao., Yujun Huang., Raja Fayad, Gregory T. Spear and Liang Qiao. (2004). Induction of mucosal and systemic Neutralizing Antibodies against Human Immunodeficiency Virus Type 1 (HIV-1) by Oral Immunization with Bovine Papillomavirus-HIV-1 gp41 Chimeric Virus Like particles. *Journal of Virology* vol 78 No. 15 p 8324-8348
- Zwick, Michael B., et al.(2001). Broadly Neutralizing Antibodies Targeted to the Membran-Proximal External Region of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Glycoprotein gp41. *Journal of Virology*, Vol. 75, No. 22, 10892-10905.

Zwick, Michael B., et al.(2005). Anti-Human Immunodeficiency Virus Tipe 1(HIV-1) Antibodies 2F5 and 4E10 Require Surprisingly Few Crucial Residues in the Membran-Proximal External Region of Glycoprotein gp41 to Neutralize HIV-1. *Journal of Virology*, Vol. 79, No.2,1252-12



## LAMPIRAN

### Lampiran 1. Pembuatan Larutan, Medium, dan *Buffer*

**Tabel 3.1** Pembuatan Larutan, Medium, dan *Buffer*

<b>Larutan, Buffer dan Medium</b>	<b>Cara Pembuatan</b>
Luria Bertani (LB) Cair 250 ml	Sebanyak 2,5 g tripton, 1,25 g yeast extract, 1,25 g NaCl dicampurkan dan dilarutkan dengan aquades steril, 250 mL kemudian campuran disterilisasi dengan autoklaf pada suhu 121°C, tekanan 1 atm, selama 15 menit
Luria Bertani (LB) Agar 200 ml	Sebanyak 8 g LB Agar di larutkan dalam 200 mL aquades steril kemudian larutan disterilisasi dengan autoklaf pada suhu 121°C, tekanan 1 atm, selama 15 menit
Medium Super Optimal Catabolite (SOC)	Sebanyak 10 g bakto tripton, 5 g Yeast extract, 0,5 g NaCl, dan 10 mL KCl 250 mM ditambahkan akuades hingga mencapai volume 1000 mL. pH larutan di ukur (pH 7). Medium kemudian disterilisasi, MgCl <sub>2</sub> dan 20 ml glukosa ditambahkan sesaat sebelum digunakan
Ampisilin 100 µg/µL	Ampisilin 100 mg dilarutkan dalam aquades 10 mL
<i>Buffer</i> TAE 50 x	Sebanyak 48,4 g tri base 7,4g EDTA dan 11,42 mL asam asetat glasial ditambahkan akuades hingga mencapai volume 200 mL
<i>Buffer</i> TAE 1x	Sebanyak 4 mL buffer TAE 50x ditambah dengan 196 mL akuades
<i>Buffer</i> P1	Sebanyak 800 µL Tris-Cl 10 mM (pH 8,0), 80 µL EDTA 1 mM (pH 8,0) dan 400 µL RNaseA 10 mg/mL ditambahkan akuades hingga mencapai volume 40 mL
<i>Buffer</i> P2	Sebanyak 0,32 g NaOH padat dan 4 mL Sodium Dodecyl Sulfate (SDS) 1 % dilarutkan dengan akuades hingga mencapai volume 40 mL

<i>Buffer P3</i>	Sebanyak 11,7 g KCl dan 4,6 ml asam asetat glacial dilarutkan dengan akuades hingga mencapai volume 40 mL
Larutan MgCl <sub>2</sub>	Sebanyak 2,033 g MgCl <sub>2</sub> ditambah dengan akuades hingga mencapai volume 100 mL. Larutan kemudian disterilisasi dan disimpan didalam ruangan pendingin
Larutan CaCl <sub>2</sub>	Sebanyak 1,665 g CaCl <sub>2</sub> ditambah dengan akuades hingga mencapai volume 150 mL. larutan kemudian disterilisasi dan disimpan didalam ruangan pendingin
<i>Loading Buffer 6 x</i>	Sebanyak 1,5 g bromfenol biru dan 3 mL gliserol ditambah akuades hingga mencapai volume 10 mL
<i>Wash buffer (1 Liter)</i>	Sebanyak 7,8 NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 2 H <sub>2</sub> O, 17,5 g NaCl, dan 1,36 g imidazol dicampurkan ke dalam 800 mL akuades dan diaduk hingga rata. Campuran diatur pHnya sampai 8 menggunakan NaOH 1 M.
PBS-Tween	Sebanyak 500 µL Tween-20 dicampurkan ke dalam 1 L PBS 1x
<i>Carbonate coating buffer pH 9,6</i>	Sebanyak 5,86 g Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> , 3,18 g NaHCO <sub>3</sub> , dan 0,4 g NaNO <sub>3</sub> dicampurkan dengan aquades steril sampai volumenya 200 mL.
<i>Blocking Solution</i>	Sebanyak 1 g gelatin dilarutkan ke dalam 100 mL PBS 1x
Substrat OPD	Sebanyak 2,6 g sodium sitrat dan 6,9 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> dilarutkan didalam 50 mL aquades steril. Sebanyak 50 mg OPD dicampurkan ke dalam larutan tersebut, lalu ditambahkan 1,2 mL H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 3%
<i>Dilution buffer (1,5%)</i>	Sebanyak 1,5 g gelatin dilarutkan dalam 100 mL PBS 1x. dilakukan pemanasan untuk melarutkan gelatin
<i>Dilution buffer (1%)</i>	Sebanyak 16,666 mL dilution buffer 1,5 % dilarutkan dalam 8,334 mL PBS 1x
<i>Dilution buffer (0,1%)</i>	Sebanyak 3,3 mL dilution buffer 1,5% dilarutkan dalam 46,7 mL PBS 1x.
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 2,5 M	Sebanyak 1,332 mL H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 18,76 M dilarutkan dalam 8,668 mL aquadest

**Lampiran 2.** Optimasi ELISA pada beberapa pengenceran serum mencit yang divaksin pcDNA 3.1 HA-MPER-1 terhadap pengenceran berseri peptida ELDKWAS

Peta plate ELISA : pengenceran peptida ELDKWAS sesuai dengan arah baris A ke H. Pengenceran peptida: 15, 12,5, 10, 7,5 µg/ml; pengenceran antibodi dilakukan dari lajur 3 ke 6 dan lajur 5 ke 8. Pengenceran antibodi : 1/12,5; 1/25; 1/50; 1/100.

Hasil Pembacaan ELISA reader sesuai dengan plate I

	Kelompok	Sumuran	Pengenceran Serum							
			3	4	5	6	9	10	11	12
Peptida ELDKWAS (µg/µL)	KELOMPOK KONTROL	A	15	15	15	15	15	15	15	15
			1/12,5	1/12,5	1/25	1/25	1/50	1/50	1/100	1/100
		B	12,5	12,5	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	1/100	1/100
		C	10	10	10	10	10	10	10	10
			1/12,5	1/12,5	1/25	1/25	1/50	1/50	1/100	1/100
		D	7,5	7,5	7,5	7,5	7,5	7,5	7,5	7,5
			1/12,5	1/12,5	1/25	1/25	1/50	1/50	1/100	1/100
	KELOMPOK UJI	E	15	15	15	15	15	15	15	15
			1/12,5	1/12,5	1/25	1/25	1/50	1/50	1/100	1/100
		F	12,5	12,5	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	1/100	1/100
G		10	10	10	10	10	10	10	10	
		1/12,5	1/12,5	1/25	1/25	1/50	1/50	1/100	1/100	
H		7,5	7,5	7,5	7,5	7,5	7,5	7,5	7,5	
		1/12,5	1/12,5	1/25	1/25	1/50	1/50	1/100	1/100	

(Lanjutan)

**Tabel 4.1.** Hasil optimasi ELISA beberapa pengenceran serum mencit yang divaksin pcDNA 3.1 HA-MPER-1 terhadap pengenceran berseri peptida ELDKWAS

1. Peptida ELDKWAS 15 µg dengan antibodi beberapa pengenceran antibodi									
Antibodi dari serum ke4 setelah divaksin pcDNA 3.1 HA-MPER-1					Antibodi mencit sebelum diimunisasi				
Pengenceran antibodi	1:12.5	1:25	1:50	1:100	Pengenceran antibodi	1:12.5	1:25	1:50	1:100
	0,41	0,392	0,406	0,387		0,381	0,403	0,387	0,383
	0,415	0,39	0,394	0,381		0,403	0,4	0,393	0,386
<b>Rata-rata</b>	<b>0,4125</b>	<b>0,391</b>	<b>0,4</b>	<b>0,384</b>	<b>Rata-rata</b>	<b>0,392</b>	<b>0,4015</b>	<b>0,39</b>	<b>0,3845</b>

2. Peptida ELDKWAS 12,5 µg dengan antibodi beberapa pengenceran antibodi									
Antibodi dari serum ke4 setelah divaksin pcDNA 3.1 HA-MPER-1					Antibodi mencit sebelum diimunisasi				
Pengenceran antibodi	1:12.5	1:25	1:50	1:100	Pengenceran antibodi	1:12.5	1:25	1:50	1:100
	0,393	0,378	0,389	0,391		0,42	0,53	0,418	0,391
	0,402	0,364	0,37	0,404		0,416	0,401	0,404	0,404
<b>Rata-rata</b>	<b>0,3975</b>	<b>0,371</b>	<b>0,3795</b>	<b>0,3975</b>	<b>Rata-rata</b>	<b>0,418</b>	<b>0,4655</b>	<b>0,411</b>	<b>0,3975</b>

3. Peptida ELDKWAS 10 µg dengan antibodi beberapa pengenceran antibodi									
Antibodi dari serum ke4 setelah divaksin pcDNA 3.1 HA-MPER-1					Antibodi mencit sebelum diimunisasi				
Pengenceran antibodi	1:12.5	1:25	1:50	1:100	Pengenceran antibodi	1:12.5	1:25	1:50	1:100
	0,395	0,383	0,383	0,393		0,393	0,405	0,406	0,37
	0,39	0,367	0,393	0,384		0,408	0,39	0,384	0,395
<b>Rata-rata</b>	<b>0,3925</b>	<b>0,375</b>	<b>0,388</b>	<b>0,3885</b>	<b>Rata-rata</b>	<b>0,4005</b>	<b>0,3975</b>	<b>0,395</b>	<b>0,3825</b>

4. Peptida ELDKWAS 7,5 µg dengan antibodi beberapa pengenceran antibodi									
Antibodi dari serum ke4 setelah divaksin pcDNA 3.1 HA-MPER-1					Antibodi mencit sebelum diimunisasi				
Pengenceran antibodi	1:12.5	1:25	1:50	1:100	Pengenceran antibodi	1:12.5	1:25	1:50	1:100
	0,387	0,387	0,382	0,371		0,406	0,402	0,406	0,383
	0,392	0,369	0,367	0,357		0,414	0,398	0,39	0,38
<b>Rata-rata</b>	<b>0,3895</b>	<b>0,378</b>	<b>0,3745</b>	<b>0,364</b>	<b>Rata-rata</b>	<b>0,41</b>	<b>0,4</b>	<b>0,398</b>	<b>0,3815</b>

**Lampiran 3.** Hasil kasar uji optimasi ELISA beberapa pengenceran serum mencit yang divaksin pcDNA 3.1 HA-MPER-1 terhadap konsentrasi peptida ELDKWAS 15  $\mu\text{g/mL}$

Peta plate ELISA : pengenceran peptida ELDKWAS sesuai dengan arah baris A ke B. pengenceran antibodi dilakukan dari lajur 1 ke 8. Pengenceran antibodi : 1/6,25; 1/12,5; 1/25; 1/50.

	Sumuran	Pengenceran Serum							
		1	2	3	4	5	6	7	8
Peptida ELDKWAS ( $\mu\text{g/ml}$ )	A	15	15	15	15	15	15	15	15
		1/6,25	1/6,25	1/12,5	1/12,5	1/25	1/25	1/50	1/50
	B	15	15	15	15	15	15	15	15
		1/6,25	1/6,25	1/12,5	1/12,5	1/25	1/25	1/50	1/50

**Tabel 4.2.** Hasil optimasi ELISA beberapa pengenceran serum mencit yang divaksin pcDNA 3.1 HA-MPER-1 terhadap konsentrasi peptida ELDKWAS 15  $\mu\text{g/mL}$

1. Peptida ELDKWAS 15  $\mu\text{g}$  dengan antibodi beberapa pengenceran antibodi

Antibodi dari serum 1 sebelum di vaksin pc DNA HA-MPER-1					Antibodi dari serum ke4 setelah divaksin pcDNA 3.1 HA-MPER-1				
Pengenceran antibodi	1/6,25	1/12,5	1/25	1/50	Pengenceran antibodi	1/6,25	1/12,5	1/25	1/50
	0,359	0,389	0,391	0,365		0,375	0,377	0,394	0,362
	0,362	0,389	0,365	0,381		0,336	0,348	0,374	0,368
<b>Rata-rata</b>	0,3605	0,389	0,378	0,373	<b>Rata-rata</b>	0,3555	0,3625	0,384	0,365

**Lampiran 4.** Hasil kasar uji optimasi ELISA beberapa pengenceran serum mencit yang divaksin pcDNA 3.1 HA-MPER-1, pcDNA3.1 HA, dan pcDNA3.1 *wildtype* terhadap konsentrasi peptida ELDKWAS 15 µg/mL

Peta plate ELISA : pengenceran peptida ELDKWAS sesuai dengan arah baris A ke D. pengenceran antibodi dilakukan dari lajur 1 ke 8. Pengenceran antibodi : 1/12,5; 1/25; 1/50.

	Sumuran	Pengenceran Serum							
		1	2	3	4	5	6	7	8
Peptida ELDKWAS (µg/µl)	A	15	15	15	15	15	15	15	15
		1/6,25	1/6,25	1/12,5	1/12,5	1/25	1/25	1/50	1/50
	B	15	15	15	15	15	15	15	15
		1/6,25	1/6,25	1/12,5	1/12,5	1/25	1/25	1/50	1/50
	C	15	15	15	15	15	15	15	15
		1/6,25	1/6,25	1/12,5	1/12,5	1/25	1/25	1/50	1/50
	D	15	15	15	15	15	15	15	15
		1/6,25	1/6,25	1/12,5	1/12,5	1/25	1/25	1/50	1/50

**Tabel 4.3.** Hasil optimasi ELISA beberapa pengenceran serum mencit yang divaksin pcDNA 3.1 HA-MPER-1, pcDNA3.1 HA, dan pcDNA3.1 *wildtype* terhadap konsentrasi peptida ELDKWAS 15 µg/mL

Peptida ELDKWAS 15 µg dengan antibodi beberapa pengenceran antibodi							
Antibodi dari serum 1 sebelum di vaksin pc DNA HA-MPER-1				Antibodi dari serum ke4 setelah divaksin pcDNA 3.1 HA-MPER-1			
Pengenceran antibodi	1/12,5	1/25	1/50	Pengenceran antibodi	1/12,5	1/25	1/50
	1,095	1,125	1,073		1,153	1,17	1,134
	1,111	1,127	1,114		1,16	1,158	1,112
<b>Rata-rata</b>	1,103	1,126	1,0935	<b>Rata-rata</b>	1,1565	1,164	1,123
Antibodi dari serum 1 sebelum di vaksin pc DNA HA				Antibodi dari serum ke4 setelah divaksin pcDNA 3.1 Wildtype			
Pengenceran antibodi	1/12,5	1/25	1/50	Pengenceran antibodi	1/12,5	1/25	1/50
	1,173	1,175	1,158		1,02	1,042	0,959
	1,178	1,169	1,133		1,037	1,03	0,91
<b>Rata-rata</b>	1,1755	1,172	1,1455	<b>Rata-rata</b>	1,0285	1,036	0,9345



**Lampiran 5.** Hasil Optimasi ELISA dengan kontrol negatif

**Tabel 4.4.** Hasil optimasi ELISA penentuan reaktivitas peptida terhadap beberapa kelompok perlakuan dengan atau tanpa serum mencit sebelum diimunisasi vaksin pcDNA3.1 HA-MPER-1 dengan serum sesudah divaksinasi *booster* ke-2 dengan menggunakan konsentrasi serum 1/25 pada konsentrasi peptida ELDKWAS 15µg/mL

Perlakuan		data 1	data 2	rata-rata
A	gelatin + Antibodi II (anti-mouse berlabel biotin)	0,0730	0,0780	0,0755
B	ELDKWAS 15 µg/ml + gelatin + Antibodi II (anti-mouse berlabel biotin)	0,0570	0,0550	0,0560
C	HM I : serum I + ELDKWAS 15 + gelatin + Antibodi II (anti-mouse berlabel biotin)	0,3430	0,3340	0,3385
D	HM I : serum IV + ELDKWAS 15 + gelatin + Antibodi II (anti-mouse berlabel biotin)	0,3920	0,4200	0,4060
E	HM I : serum I + gelatin + Antibodi II (anti-mouse berlabel biotin)	0,3940	0,3960	0,3950
F	HM I : serum IV + gelatin + Antibodi II (anti-mouse berlabel biotin)	0,3740	0,3840	0,3790

**Lampiran 6.** Hasil Optimasi ELISA pada *blocking buffer* dan *dilution buffer*

**Tabel 4.5.** Hasil optimasi ELISA antara perlakuan antara *blocking buffer* 1% gelatin dengan *blocking buffer* 2%.

Kelompok Perlakuan	buffer blocking 1% gelatin			buffer blocking 2% gelatin		
	data 1	data 2	rata-rata	data 1	data 2	rata-rata
A gelatin + Antibodi II	0,067	0,069	0,068	0,086	0,099	0,0925
B ELDKWAS 15 µg/ml + gelatin + Antibodi II	0,075	0,063	0,069	0,202	0,109	0,1555
C HM I : serum I + ELDKWAS 15 + gelatin + Antibodi II	0,371	0,353	0,362	0,356	0,367	0,3615
D HM I : serum IV + ELDKWAS 15 + gelatin + Antibodi II	0,389	0,385	0,387	0,358	0,361	0,3595
E HM I : serum I + gelatin + Antibodi II	0,402	0,384	0,393	0,391	0,377	0,384
F HM I : serum IV + gelatin + Antibodi II	0,399	0,388	0,3935	0,384	0,414	0,399

(lanjutan)

**Tabel 4.6.** Hasil optimasi ELISA antara perlakuan dengan *dilution buffer* 0,1%.

	dilution buffer 0,1%			dilution buffer 1%			dilution buffer 1,5%			dilution buffer 2%		
	data 1	data 2	rata-rata	data 1	data 2	rata-rata	data 1	data 2	rata-rata	data 1	data 2	rata-rata
A	0,086	0,099	0,0925	0,087	0,082	0,0845	0,077	0,071	0,074	0,073	0,069	0,071
B	0,202	0,109	0,1555	0,124	0,103	0,1135	0,079	0,072	0,0755	0,07	0,076	0,073
D	0,356	0,367	0,3615	0,302	0,327	0,3145	0,282	0,26	0,271	0,291	0,276	0,2835
E	0,358	0,361	0,3595	0,331	0,342	0,3365	0,329	0,336	0,3325	0,312	0,312	0,312
F	0,391	0,377	0,384	0,399	0,312	0,3555	0,323	0,325	0,324	0,296	0,305	0,3005
G	0,384	0,414	0,399	0,366	0,349	0,3575	0,34	0,334	0,337	0,323	0,325	0,324

1% 1,5% dan 2%

Keterangan :

A= gelatin + Antibodi II (anti-*mouse* berlabel biotin)B= ELDKWAS 15 µg/mL + gelatin+ Antibodi II (anti-*mouse* berlabel biotin)C= ELDKWAS 15 µg/mL + gelatin+ serum I + Antibodi II (anti-*mouse* berlabel biotin)D= ELDKWAS 15 µg/mL + gelatin+ serum IV + Antibodi II (anti-*mouse* berlabel biotin)E= Serum I+ gelatin+ Antibodi II (anti-*mouse* berlabel biotin)F= Serum I + gelatin+ Antibodi II (anti-*mouse* berlabel biotin)

**Lampiran 7.** Peta ELISA pada uji ELISA terhadap semua kelompok mencit yang diimunisasi vaksin pcDNA3.1 *wildtype*, pcDNA3.1 HA, pcDNA3.1 HA-MPER-1 dan pcDNA3.1 HA-MPER-2

		Pengenceran Serum												
		Mencit	1		2		3		4		5		6	
		Sumuran	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Kelompok kontrol (-)	A	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT
	B	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT
	C	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT
	D	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT
Kelompok kontrol (+)	E	HA	HA	HA	HA	HA	HA	HA	HA	HA	HA	HA	HA	HA
	F	HA	HA	HA	HA	HA	HA	HA	HA	HA	HA	HA	HA	HA
	G	HA	HA	HA	HA	HA	HA	HA	HA	HA	HA	HA	HA	HA
	H	HA	HA	HA	HA	HA	HA	HA	HA	HA	HA	HA	HA	HA

		Pengenceran Serum												
		Mencit	1		2		3		4		5		6	
		Sumuran	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Kelompok Uji	A	HMI	HMI	HMI	HMI	HMI	HMI	HMI	HMI	HMI	HMI	HMI	HMI	HMI
	B	HMI	HMI	HMI	HMI	HMI	HMI	HMI	HMI	HMI	HMI	HMI	HMI	HMI
	C	HMI	HMI	HMI	HMI	HMI	HMI	HMI	HMI	HMI	HMI	HMI	HMI	HMI
	D	HMI	HMI	HMI	HMI	HMI	HMI	HMI	HMI	HMI	HMI	HMI	HMI	HMI
Kelompok Uji	E	HMII	HMII	HMII	HMII	HMII	HMII	HMII	HMII	HMII	HMII	HMII	HMII	HMII
	F	HMII	HMII	HMII	HMII	HMII	HMII	HMII	HMII	HMII	HMII	HMII	HMII	HMII
	G	HMII	HMII	HMII	HMII	HMII	HMII	HMII	HMII	HMII	HMII	HMII	HMII	HMII
	H	HMII	HMII	HMII	HMII	HMII	HMII	HMII	HMII	HMII	HMII	HMII	HMII	HMII

Keterangan :

Warna hijau : Serum I (serum sebelum diimunisasi vaksin DNA)

Warna merah : Serum II (serum 2 minggu setelah diimunisasi vaksin DNA pertama)

Warna biru : Serum III (serum 2 minggu setelah diimunisasi vaksin DNA kedua [booster ke-1])

Warna orange: Serum IV (serum 2 minggu setelah diimunisasi vaksin DNA ketiga [booster ke-2])

**Lampiran 8.** Hasil kasar uji ELISA serum mencit divaksinasi pcDNA3.1 *wildtype* terhadap peptida ELDKWAS 15 µg/mL

Perlakuan 1		Vaksin pcDNA3.1 <i>wildtype</i>					
Serum I							
S1	No Individu						
	1	2	3	4	5	6	
OD 490	0,2890	0,3280	0,3580	0,2200	0,3690	0,3360	
	0,2930	0,3260	0,3080	0,1980	0,3910	0,3630	
Rata-rata	0,2910	0,3270	0,3330	0,2090	0,3800	0,3495	
Serum II							
S2	No Individu						
	1	2	3	4	5	6	
OD 490	0,3860	0,3730	0,3610	0,2890	0,4410	0,4710	
	0,3730	0,3750	0,3480	0,3110	0,4200	0,5700	
Rata-rata	0,3795	0,3740	0,3545	0,3000	0,4305	0,5205	
Serum III							
S3	No Individu						
	1	2	3	4	5	6	
OD 490	0,3380	0,3260	0,3270	0,2670	0,3500	0,4290	
	0,3210	0,2900	0,3080	0,2790	0,3440	0,5020	
Rata-rata	0,3295	0,3080	0,3175	0,2730	0,3470	0,4655	
Serum IV							
S4	No Individu						
	1	2	3	4	5	6	
OD 490	0,2480	0,2480	0,3180	0,1560	0,3580	0,2710	
	0,2620	0,2530	0,3110	0,1720	0,3400	0,3330	
Rata-rata	0,2550	0,2505	0,3145	0,1640	0,3490	0,3020	

**Lampiran 9.** Hasil kasar uji ELISA serum mencit divaksinasi pcDNA 3.1 HA terhadap peptida ELDKWAS 15 µg/mL

Perlakuan 2		Vaksin pcDNA3.1 HA					
Serum I							
S1	No Individu						
	1	2	3	4	5	6	
OD 490	0,4170	0,2880	0,2920	0,1790	0,2920	0,2690	
	0,4190	0,3040	0,2840	0,1860	0,2910	0,3280	
Rata-rata	0,4180	0,2960	0,2880	0,1825	0,2915	0,2985	
Serum II							
S2	No Individu						
	1	2	3	4	5	6	
OD 490	0,3520	0,3570	0,3530	0,3530	0,3890	0,2220	
	0,3380	0,3770	0,3380	0,3340	0,3820	0,3100	
Rata-rata	0,3450	0,3670	0,3455	0,3435	0,3855	0,2660	
Serum III							
S3	No Individu						
	1	2	3	4	5	6	
OD 490	0,4130	0,4140	0,2820	0,4410	0,3940	0,2780	
	0,4170	0,4070	0,2770	0,3940	0,3800	0,3000	
Rata-rata	0,4150	0,4105	0,2795	0,4175	0,3870	0,2890	
Serum IV							
S4	No Individu						
	1	2	3	4	5	6	
OD 490	0,4920	0,4740	0,2750	0,3320	0,3750	0,3400	
	0,4290	0,4400	0,3060	0,2880	0,3740	0,3360	
Rata-rata	0,4605	0,4570	0,2905	0,3100	0,3745	0,3380	

**Lampiran 10.** Hasil kasar uji ELISA serum mencit divaksinasi pcDNA3.1 HA-MPER-1 terhadap peptida ELDKWAS 15  $\mu$ g/ml

Perlakuan 3	Vaksin pcDNA3.1 HA-MPER-1					
Serum I						
S1	No Individu					
	1	2	3	4	5	6
OD 490	0,1520	0,2170	0,3840	0,3970	0,2600	0,3260
	0,1580	0,2280	0,4000	0,3840	0,2370	0,3220
Rata-rata	0,1550	0,2225	0,3920	0,3905	0,2485	0,3240
Serum II						
S2	No Individu					
	1	2	3	4	5	6
OD 490	0,3040	0,3550	0,3450	0,3940	0,2630	0,4790
	0,2570	0,3260	0,3310	0,3960	0,2490	0,4740
Rata-rata	0,2805	0,3405	0,3380	0,3950	0,2560	0,4765
Serum III						
S3	No Individu					
	1	2	3	4	5	6
OD 490	0,2530	0,3170	0,3120	0,4080	0,4630	0,4190
	0,2430	0,3120	0,3010	0,4630	0,4320	0,4900
Rata-rata	0,2480	0,3145	0,3065	0,4355	0,4475	0,4545
Serum IV						
S4	No Individu					
	1	2	3	4	5	6
OD 490	0,4150	0,2900	0,3700	0,4210	0,3460	0,4160
	0,4180	0,3410	0,3860	0,4050	0,3160	0,4160
Rata-rata	0,4165	0,3155	0,3780	0,4130	0,3310	0,4160

**Lampiran 11.** Hasil kasar uji ELISA serum mencit divaksinasi pcDNA3.1 HA-MPER-2 terhadap peptida ELDKWAS 15  $\mu\text{g/mL}$

Perlakuan 4		Vaksin pcDNA3.1 HA-MPER-2					
Serum I							
S1	No Individu						
	1	2	3	4	5	6	
OD 490	0,2950	0,3660	0,3270	0,3160	0,3210	0,3360	
	0,3010	0,3300	0,3160	0,3650	0,2870	0,3630	
Rata-rata	0,2980	0,3480	0,3215	0,3405	0,3040	0,3495	
Serum II							
S2	No Individu						
	1	2	3	4	5	6	
OD 490	0,2670	0,3250	0,2060	0,3340	0,2410	0,4710	
	0,2460	0,3380	0,2130	0,3320	0,2380	0,5700	
Rata-rata	0,2565	0,3315	0,2095	0,3330	0,2395	0,5205	
Serum III							
S3	No Individu						
	1	2	3	4	5	6	
OD 490	0,3310	0,3340	0,3620	0,3320	0,3300	0,4290	
	0,3030	0,3220	0,3500	0,3080	0,3270	0,5020	
Rata-rata	0,3170	0,3280	0,3560	0,3200	0,3285	0,4655	
Serum IV							
S4	No Individu						
	1	2	3	4	5	6	
OD 490	0,2590	0,3110	0,2910	0,2980	0,1920	0,2710	
	0,2810	0,3030	0,2170	0,2550	0,2100	0,3330	
Rata-rata	0,2700	0,3070	0,2540	0,2765	0,2010	0,3020	

**Lampiran 12.** Uji statistik dengan SPSS 19 pada berbagai kelompok kontrol dan uji pada serum I mencit (sebelum diimunisasi vaksin DNA)

Tujuan : untuk mengetahui ada atau tidaknya perbedaan yang bermakna dari kelompok pcDNA3.1 *wildtype*, pcDNA3.1 HA, pcDNA3.1 HA-MPER-1 dan pcDNA HA-MPER-2 pada serum I mencit (sebelum diimunisasi vaksin DNA)

Hipotesis :

Ho = tidak terdapat perbedaan bermakna terhadap nilai absorbansi ELISA serum mencit antar kelompok

Ha = terdapat perbedaan bermakna terhadap nilai absorbansi ELISA serum mencit antar kelompok

Uji Statistik : Uji F

Kriteria uji :

Jika signifikansi  $< 0,05$ , Ho ditolak

Jika signifikansi  $> 0,05$ , Ho diterima

Hasil :

Tests of Normality							
		Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>			Shapiro-Wilk		
serum_1		Statistic	Df	Sig.	Statistic	df	Sig.
OD_1	1	,247	6	,200*	,910	6	,437
	2	,321	6	,053	,859	6	,187
	3	,189	6	,200*	,921	6	,515
	4	,227	6	,200*	,878	6	,262

a. Lilliefors Significance Correction

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



(lanjutan)

Tests of Normality							
		Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>			Shapiro-Wilk		
serum_1		Statistic	Df	Sig.	Statistic	df	Sig.
OD_1	1	,247	6	,200 <sup>*</sup>	,910	6	,437
	2	,321	6	,053	,859	6	,187
	3	,189	6	,200 <sup>*</sup>	,921	6	,515
	4	,227	6	,200 <sup>*</sup>	,878	6	,262

Test of Homogeneity of Variance						
		Levene Statistic	df1	df2	Sig.	
OD_1	Based on Mean	2,432	3	20	,095	
	Based on Median	2,224	3	20	,117	
	Based on Median and with adjusted df	2,224	3	13,721	,131	
	Based on trimmed mean	2,403	3	20	,098	

Keterangan : 1= pcDNA3.1 *wildtype*

2= pcDNA3.1 HA

3= pcDNA3.1 HA-MPER-1

4= pcDNA3.1 HA-MPER-2

Dilihat dari Uji Normalitas dan homogenitas > 0,05 dapat ditarik kesimpulan data terdistribusi normal. untuk melihat adanya perbedaan antar kelompok dilakukan uji ANOVA

Hasil Analisis dengan uji ANOVA

ANOVA					
OD_1					
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	,005	3	,002	,388	,763
Within Groups	,094	20	,005		
Total	,099	23			

Kesimpulan

Ho diterima, tidak terdapat perbedaan bermakna antar kelompok pada serum I mencit (sebelum diimunisasi dengan vaksin)

**Lampiran 13.** Uji statistik dengan SPSS 19 pada berbagai kelompok kontrol dan uji pada serum II mencit (serum diambil dua minggu setelah diimunisasi vaksin DNA)

Tujuan : untuk mengetahui ada atau tidaknya perbedaan yang bermakna dari kelompok pcDNA3.1 *wildtype*, pcDNA3.1 HA, pcDNA3.1 HA-MPER-1 dan pcDNA HA-MPER-2 pada serum II mencit (serum diambil dua minggu setelah diimunisasi vaksin DNA)

Hipotesis :

Ho = tidak terdapat perbedaan bermakna terhadap nilai absorbansi ELISA serum mencit antar kelompok

Ha = terdapat perbedaan bermakna terhadap nilai absorbansi ELISA serum mencit antar kelompok

Uji Statistik : Uji F

Kriteria uji :

Jika signifikansi  $< 0,05$ , Ho ditolak

Jika signifikansi  $> 0,05$ , Ho diterima

Hasil :

Tests of Normality							
		Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>			Shapiro-Wilk		
serum_2		Statistic	Df	Sig.	Statistic	df	Sig.
OD_2	1	,239	6	,200*	,944	6	,695
	2	,347	6	,023	,838	6	,125
	3	,203	6	,200*	,951	6	,746
	4	,270	6	,196	,859	6	,187

a. Lilliefors Significance Correction

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

(lanjutan)

Test of Homogeneity of Variance					
		Levene Statistic	df1	df2	Sig.
OD_2	Based on Mean	1,193	3	20	,338
	Based on Median	1,050	3	20	,392
	Based on Median and with adjusted df	1,050	3	15,595	,398
	Based on trimmed mean	1,204	3	20	,334

Keterangan : 1= pcDNA3.1 *wildtype*  
 2= pcDNA3.1 HA  
 3= pcDNA3.1 HA-MPER-1  
 4= pcDNA3.1 HA-MPER-2

Dilihat dari Uji Normalitas dan homogenitas  $> 0,05$  dapat ditarik kesimpulan data terdistribusi normal. untuk melihat adanya perbedaan antar kelompok dilakukan uji ANOVA

Hasil Analisis dengan uji ANOVA

ANOVA					
OD_2	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	,019	3	,006	,957	,432
Within Groups	,132	20	,007		
Total	,151	23			

Kesimpulan  
 Ho diterima, tidak terdapat perbedaan bermakna antar kelompok pada serum II mencit (sebelum diimunisasi dengan vaksin)

**Lampiran 14.** Uji statistik dengan SPSS 19 pada berbagai kelompok kontrol dan uji pada serum III mencit (serum diambil dua minggu setelah diimunisasi vaksin DNA yang kedua)

Tujuan : untuk mengetahui ada atau tidaknya perbedaan yang bermakna dari kelompok pcDNA3.1 *wildtype*, pcDNA3.1 HA, pcDNA3.1 HA-MPER-1 dan pcDNA HA-MPER-2 pada serum III mencit (serum diambil dua minggu setelah diimunisasi vaksin DNA yang kedua)

Hipotesis :

Ho = tidak terdapat perbedaan bermakna terhadap nilai absorbansi ELISA serum mencit antar kelompok

Ha = terdapat perbedaan bermakna terhadap nilai absorbansi ELISA serum mencit antar kelompok

Uji Statistik : Uji F

Kriteria uji :

Jika signifikansi  $< 0,05$ , Ho ditolak

Jika signifikansi  $> 0,05$ , Ho diterima

Hasil :

		Tests of Normality					
		Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>			Shapiro-Wilk		
serum_3		Statistic	Df	Sig.	Statistic	df	Sig.
OD_3	1	,292	6	,121	,841	6	,132
	2	,292	6	,121	,762	6	,026
	3	,277	6	,165	,850	6	,158
	4	,235	6	,200*	,908	6	,426

a. Lilliefors Significance Correction

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

(lanjutan)

Test of Homogeneity of Variance					
		Levene Statistic	df1	df2	Sig.
OD_3	Based on Mean	,940	3	20	,440
	Based on Median	,748	3	20	,536
	Based on Median and with adjusted df	,748	3	16,893	,538
	Based on trimmed mean	,945	3	20	,438

Keterangan : 1= pcDNA3.1 *wildtype*  
 2= pcDNA3.1 HA  
 3= pcDNA3.1 HA-MPER-1  
 4= pcDNA3.1 HA-MPER-2

Dilihat dari Uji Normalitas dan homogenitas terdapat nilai signifikansi  $< 0,05$  dapat ditarik kesimpulan data terdistribusi tidak normal. untuk melihat adanya perbedaan antar kelompok dilakukan uji Kruskal Wallis

Hasil Analisis dengan uji Kruskal Wallis

Ranks				Test Statistics <sup>a,b</sup>	
serum_3		N	Mean Rank	OD_3	
OD_3	1	6	11,75	Chi-Square	,215
	2	6	13,17	Df	3
	3	6	13,17	Asymp. Sig.	,975
	4	6	11,92	a. Kruskal Wallis Test	
Total		24		b. Grouping Variable: serum_3	

Kesimpulan

Ho diterima, tidak terdapat perbedaan bermakna antar kelompok pada serum III mencit (serum 2 minggu setelah diimunisasi vaksin kedua)

**Lampiran 15.** Uji statistik dengan SPSS 19 pada berbagai kelompok kontrol dan uji pada serum IV mencit (serum diambil dua minggu setelah diimunisasi vaksin DNA yang ketiga)

Tujuan : untuk mengetahui ada atau tidaknya perbedaan yang bermakna dari kelompok pcDNA3.1 *wildtype*, pcDNA3.1 HA, pcDNA3.1 HA-MPER-1 dan pcDNA HA-MPER-2 pada serum IV mencit (serum diambil dua minggu setelah diimunisasi vaksin DNA yang ketiga)

Hipotesis :

Ho = tidak terdapat perbedaan bermakna terhadap nilai absorbansi ELISA serum mencit antar kelompok

Ha = terdapat perbedaan bermakna terhadap nilai absorbansi ELISA serum mencit antar kelompok

Uji Statistik : Uji F

Kriteria uji :

Jika signifikansi  $< 0,05$ , Ho ditolak

Jika signifikansi  $> 0,05$ , Ho diterima

Hasil :

Tests of Normality							
Serum_4		Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>			Shapiro-Wilk		
		Statistic	Df	Sig.	Statistic	df	Sig.
OD_4	1	,201	6	,200*	,945	6	,703
	2	,154	6	,200*	,965	6	,860
	3	,278	6	,163	,823	6	,093
	4	,188	6	,200*	,909	6	,427

a. Lilliefors Significance Correction

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

(lanjutan)

Test of Homogeneity of Variance					
		Levene Statistic	df1	df2	Sig.
OD_4	Based on Mean	,874	3	20	,471
	Based on Median	,786	3	20	,516
	Based on Median and with adjusted df	,786	3	18,610	,517
	Based on trimmed mean	,898	3	20	,460

Dilihat dari Uji Normalitas dan homogenitas nilai signifikansi  $> 0,05$  dapat ditarik kesimpulan data terdistribusi tidak normal. Untuk melihat adanya perbedaan antar kelompok dilakukan uji ANOVA

Hasil Analisis dengan uji ANOVA

ANOVA					
OD_4					
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	,061	3	,020	6,962	,002
Within Groups	,058	20	,003		
Total	,119	23			

Kesimpulan

$H_0$  ditolak, terdapat perbedaan bermakna antar kelompok pada serum IV mencit (serum 2 minggu setelah diimunisasi vaksin ketiga)

(lanjutan)

Multiple Comparisons							
Dependent Variable: OD_4							
	(I) Serum_4	(J) Serum_4	Mean Difference		95% Confidence Interval		
			(I-J)	Std. Error	Sig.	Lower Bound	Upper Bound
Tukey HSD	1	2	-.0901667 <sup>*</sup>	.0311606	.041	-.177383	-.002950
		3	-.1058333 <sup>*</sup>	.0311606	.014	-.193050	-.018617
		4	.0040833	.0311606	.999	-.083133	.091300
	2	1	.0901667 <sup>*</sup>	.0311606	.041	.002950	.177383
		3	-.0156667	.0311606	.957	-.102883	.071550
		4	.0942500 <sup>*</sup>	.0311606	.031	.007034	.181466
	3	1	.1058333 <sup>*</sup>	.0311606	.014	.018617	.193050
		2	.0156667	.0311606	.957	-.071550	.102883
		4	.1099167 <sup>*</sup>	.0311606	.010	.022700	.197133
	4	1	-.0040833	.0311606	.999	-.091300	.083133
		2	-.0942500 <sup>*</sup>	.0311606	.031	-.181466	-.007034
		3	-.1099167 <sup>*</sup>	.0311606	.010	-.197133	-.022700
LSD	1	2	-.0901667 <sup>*</sup>	.0311606	.009	-.155166	-.025167
		3	-.1058333 <sup>*</sup>	.0311606	.003	-.170833	-.040834
		4	.0040833	.0311606	.897	-.060916	.069083
	2	1	.0901667 <sup>*</sup>	.0311606	.009	.025167	.155166
		3	-.0156667	.0311606	.621	-.080666	.049333
		4	.0942500 <sup>*</sup>	.0311606	.007	.029250	.159250
	3	1	.1058333 <sup>*</sup>	.0311606	.003	.040834	.170833
		2	.0156667	.0311606	.621	-.049333	.080666
		4	.1099167 <sup>*</sup>	.0311606	.002	.044917	.174916
	4	1	-.0040833	.0311606	.897	-.069083	.069083
		2	-.0942500 <sup>*</sup>	.0311606	.007	-.159250	-.029250
		3	-.1099167 <sup>*</sup>	.0311606	.002	-.174916	-.044917

\*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

Keterangan : 1= pcDNA3.1 *wildtype*  
 2= pcDNA3.1 HA  
 3= pcDNA3.1 HA-MPER-1  
 4= pcDNA3.1 HA-MPER-2

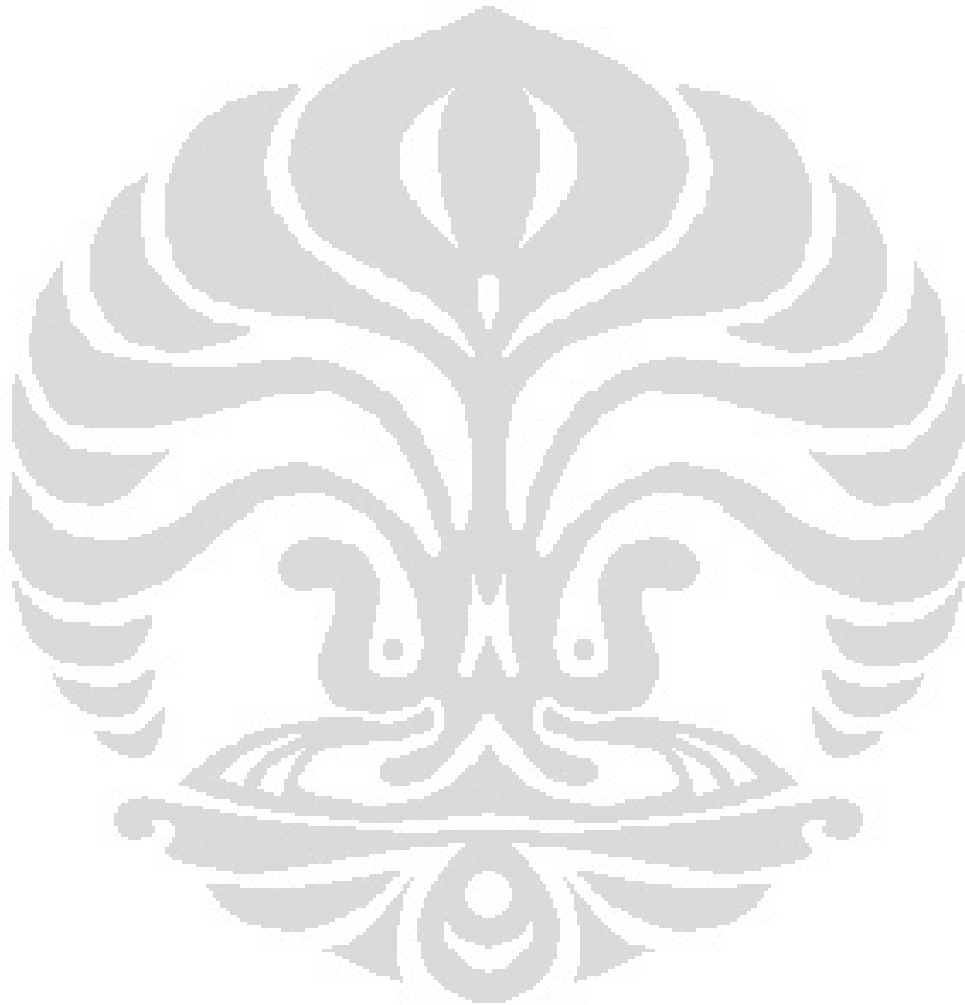
Oleh karena itu perlu dilakukan uji Post-Hoc untuk melihat pada kelompok yang mana yang memiliki perbedaan.

Kesimpulan :

1. terdapat perbedaan bermakna antara kelompok pcDNA3.1 *wildtype* dengan pcDNA3.1 HA (p=0,09)
2. terdapat perbedaan bermakna antara kelompok pcDNA3.1 *wildtype* dengan pcDNA3.1 HA-MPER-1 (p=0,03)



3. terdapat perbedaan bermakna antara kelompok pcDNA3.1 HA dengan pcDNA3.1 HA-MPER-2 ( $p=0,07$ )
4. terdapat perbedaan bermakna antara kelompok pcDNA3.1 HA-MPER-1 dengan pcDNA3.1 HA-MPER-2 ( $p=0,02$ )



## Lampiran 16. Sertifikat analisis 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-sq@base-asia.com](mailto:peptide-sq@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<sup>th</sup> 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:

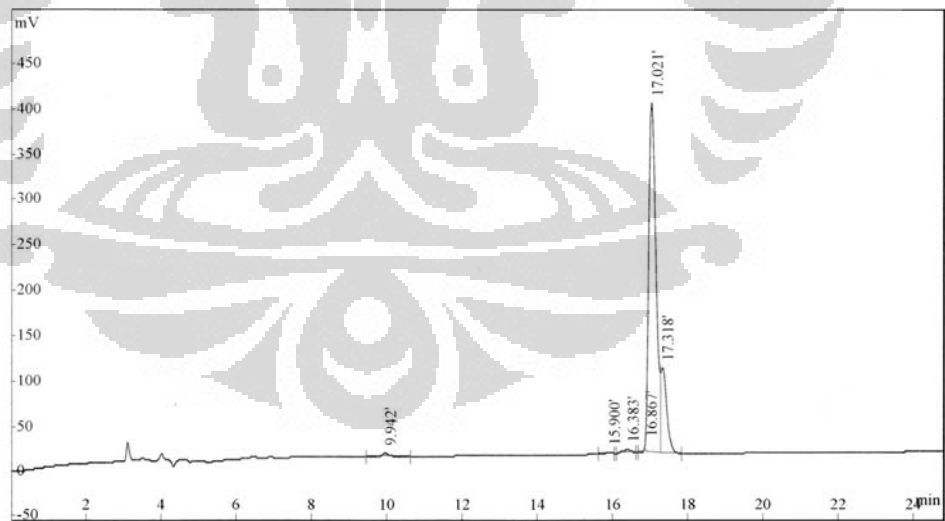
 Peptide Synthesis Officer  
 1st BASE Pte Ltd

(lanjutan)

## HPLC REPORT

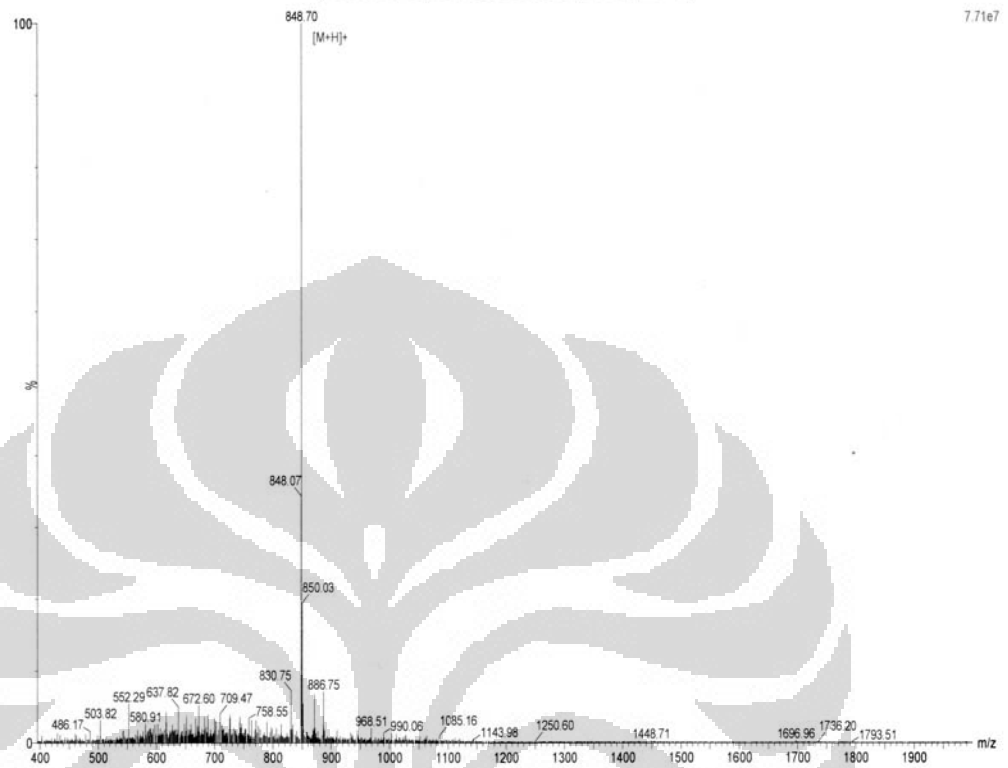
## Sample Description:

Structure : Peptide ES-7  
 Number : 0200046  
 Lot # : LT120423-LT167823  
 Column : 4.6mm\*250mm, SinoChrom ODS-BP  
 Mobile Phase : A=0.1% TFA/Acetonitrile,  
 : B=0.1%TFA/water,  
 Gradient :                   A                   B  
           0.01min       19%               81%  
           25min         34%               66%  
           25.1min       100%            0%  
           30.0min       STOP  
 Flow rate : 1.0ml/min  
 Wavelength : 220nm  
 Volume : 10ul



Rank	Time	Conc.	Area	Height
1	9.942	0.6893	43561	3866
2	15.900	0.2893	18285	1639
3	16.383	1.014	64096	3701
4	16.867	0.3513	22200	15155
5	17.021	82.88	5237742	387956
6	17.318	14.78	934225	94147
Total		100	6320109	506464

(lanjutan)

**Mass Spectrometry Report**

Sample: 167823

MW: 847.93

Item	Parameter	Item	Parameter
Probe:	ESI	Probe bias:	+4.5kv
Nebulizer Gas	1.5L/min	Detector:	1.5kv
Flow:		T.Flow:	0.2ml/min
CDL:	-20.0v	B.conc:	50%H2O50%ACN
CDL Temp:	250°C		
Block Temp:	200°C		

**Lampiran.17.** Surat Keterangan Mencit BALB/c Betina

**UNIVERSITAS GADJAH MADA**  
**LABORATORIUM PENELITIAN DAN PENGUJIAN TERPADU**  
**( LPPT – UGM )**

Bidang Layanan Penelitian Pra – Klinik dan Pengembangan Hewan Percobaan

Jl. Agro Karang Malang Kampus UGM  
 Telp. (0274) 7497705, FAX, ( 0274 ) 546868, e-mail: lppt\_info@mail.ugm.ac.id

**SURAT KETERANGAN**  
**NO : 242/LP3HP/27 -VI/2012**

Yang bertanda tangan di bawah ini :

Nama : Dr. drh. Pudji Astuti, M. P.  
 NIP : 19601012 198703 2 001  
 Jabatan : Kabid Unit Pra Klinik – LPPT UGM.

Menerangkan bahwa ;

Nama : Winie Karunia Rahmani  
 NPM : 0806398814  
 Instansi : Fakultas MIPA Departemen Farmasi UI.

Pada Bulan April 2012 membeli mencit putih (*Mus musculus L.*) betina Galur *Balb/c* usia 6 minggu sejumlah 32 (Tiga puluh dua) ekor dari Unit Pra-klinik - LPPT Universitas Gadjah Mada.

Hewan tersebut dalam keadaan masih Fertil dan tidak terinfeksi penyakit sehingga tidak menularkan penyakit. Menurut keterangan dari yang bersangkutan, Hewan tersebut akan dibawa ke IHVCB UI Salemba dan akan digunakan sebagai hewan percobaan Penelitian

Demikian surat keterangan ini dibuat, agar dapat dipergunakan sebagaimana mestinya.

Atas kerjasama yang baik diucapkan terima kasih.

Yogyakarta, 27 Juni 2012

Kabid Unit Pra-Klinik,

  
 Dr. drh. Pudji Astuti, M. P.

NIP : 19601012 198703 2 001