

**PRODUKSI PROTEIN NON STRUKTURAL 1
VIRUS DENGUE SEROTIPE 2 STRAIN INDONESIA
SEBAGAI REAGEN DIAGNOSIS INFEKSI DENGUE**

TESIS

**FITHRIYAH
NPM: 0606000106**



**UNIVERSITAS INDONESIA
FAKULTAS KEDOKTERAN
PROGRAM MAGISTER BIOMEDIK
JAKARTA
DESEMBER 2008**

HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS

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

Nama : Fithriyah

NPM : 0606 000 106

Tanda Tangan :



Tanggal : 4 Desember 2008

HALAMAN PENGESAHAN

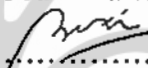
Tesis ini diajukan oleh:

Nama : Fithriyah
NPM : 0606 000 106
Program Studi : Magister Ilmu Biomedik Kekhususan Mikrobiologi
Judul Tesis : Produksi Protein Non Struktural 1 Virus Dengue Serotipe 2
Strain Indonesia Sebagai Reagen Diagnosis Infeksi Dengue


Telah berhasil dipertahankan dihadapan Dewan Penguji dan diterima sebagai bagian persyaratan yang diperlukan untuk memperoleh gelar Magister Biomedik pada Program Studi Magister Ilmu Biomedik, Fakultas Kedokteran, Universitas Indonesia.

DEWAN PENGUJI

Pembimbing I : Dra. Beti Ernawati Dewi, PhD

(..........)

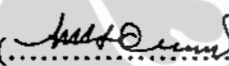
Pembimbing II : dr. T. Mirawati Sudiro, PhD

(..........)

Penguji I : dr. Anis Karuniawati, SpMK., PhD

(..........)

Penguji II : Prof. dr. Mohamad Sadikin, DSc

(..........)

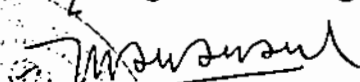
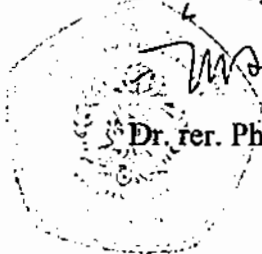
Penguji III : Vanny Narita, PhD

(..........)

Ditetapkan di : Jakarta

Tanggal : 4 Desember 2008

Ketua Program Studi Magister Ilmu Biomedik



Dr. rer. Physiol. dr. Septelia Inawati W.

KATA PENGANTAR

Alhamdulillah Rabbil'alamin

Segala puja dan puji hanya kepada Allah SWT, Rabb semesta alam, sumber segala ilmu dan pengetahuan yang atas izin dan kehendak-Nya semata penulis mampu menyelesaikan tesis ini.

Penelitian ini hanyalah sebagian kecil dari usaha manusia untuk bisa mengerti segala rahasia Allah SWT, semoga bisa menjadi suatu bentuk rasa syukur kepada-Nya atas kehidupan yang telah diberikan. Dalam kesempatan ini penulis menyampaikan terimakasih yang tulus kepada:

- **Dra. Beti Ernawati Dewi, PhD**, selaku pembimbing I yang telah mempercayakan pengerjaan penelitian ini, pengertian dan bimbingan yang diberikan atas segala kekurangan dan keterbatasan yang penulis miliki.
- **dr. T. Mirawati Sudiro, PhD**, selaku pembimbing II untuk semua bimbingan, dorongan dan contoh teladan demi kemajuan penulis.
- **Andriansjah, S.Si, M.Biomed**, atas semua bimbingan, arahan, kesabaran dan pengertian dalam mengenalkan dan mendidik penulis terhadap riset.
- **dr. Anis Karuniawati, SpMK, PhD, Prof. dr. M. Sadikin, Vanny Narita PhD**, selaku dewan penguji terima kasih atas saran, masukan dan kritikan yang membangun.
- **Guru-guru, Dosen dan semua pihak** yang telah membagi ilmu, pengalaman dan pengetahuannya tanpa henti, semoga Allah SWT memberikan keberkahan bagi segenap ilmu yang diberikan.
- **Keluarga besar Mikrobiologi FKUI** atas kerjasama, persahabatan dan kasih sayang yang sangat kondusif.
- **Mahasiswa P3S dan PPDS Mikrobiologi FKUI** atas persahabatan yang indah, pengertian, dukungan maupun uluran tangan selama penulis menempuh pendidikan dan menjalani penelitian.
- **Segenap sahabat dan teman** yang tidak bisa disebutkan satu persatu, terimakasih atas semangat, dukungan dan pengertian yang diberikan.

- **Kedua orang tuaku** terkasih dan tersayang, Ayahanda, Prof. DR. H. Musjby dan Ibunda, Hj. Nurlia Hutasuhut, atas doa yang tiada putus bagi ananda, cinta kasih sayang yang melimpah, pengertian, segenap pengorbanan serta dukungan yang diberikan demi kemajuan ananda. Semoga Allah SWT membukakan pintu rahmat dan rahim-Nya kepada papa dan mama tercinta.
- **Adikku tersayang, Ahmad Fadhil**, semoga Allah SWT memberikan petunjuk dan tuntunan-Nya dalam mencapai cita-citamu.
- **Keluarga besar Sjatha dan Hutasuhut**, untuk doa, semangat dan pengertian yang diberikan.

Hanya Allah SWT yang memberikan ilmu dan pengetahuan kepada mereka yang dikehendaki-Nya. Semoga hasil penelitian yang jauh dari sempurna ini berguna bagi kita semua.

Amin ya Rabbal Alamin.

Penulis

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

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

Nama	: Fithriyah
NPM	: 0606 000 106
Program Studi	: Magister Ilmu Biomedik
Departemen	: Mikrobiologi
Fakultas	: Kedokteran
Jenis karya	: Tesis

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:

Produksi Protein Non Struktural 1 Virus Dengue Serotipe 2 Strain Indonesia Sebagai Reagen Diagnosis Infeksi Dengue

berserta perangkat yang ada (jika diperlukan). Dengan Hak Bebas Royalti Noneksklusif ini Universitas Indonesia berhak menyimpan, mengalihmedia/formatkan, mengelola dalam bentuk pangkalan data (*database*), merawat dan mempublikasikan tugas akhir saya tanpa meminta izin dari saya sebagai penulis/pencipta dan sebagai pemilik Hak Cipta.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya.

Dibuat di : Jakarta
Pada tanggal : 4 Desember 2008

Yang menyatakan


(Fithriyah)

ABSTRAK

Nama : Fithriyah
Program Studi : Ilmu Biomedik
Judul : Produksi Protein Non Struktural 1 Virus Dengue Serotipe 2 Strain Indonesia Sebagai Reagen Diagnosis Infeksi Dengue

Infeksi virus dengue masih menjadi masalah kesehatan di Indonesia dengan angka kejadian yang cukup besar setiap tahunnya. Virus ini memiliki 3 protein struktural dan 7 protein non struktural. Salah satu dari protein non struktural yaitu non struktural 1 (NS1) memiliki tingkat imunogenisitas yang cukup tinggi dan dihasilkan di awal infeksi. Protein NS1 juga tidak menunjukkan adanya reaksi silang dengan virus golongan flavivirus lainnya, sehingga menjadi kandidat yang baik untuk digunakan sebagai antigen diagnosis infeksi dengue. Kami mencoba memproduksi protein non-struktural 1 (NS1) rekombinan dari virus dengue serotype-2 yang berasal dari strain DS-3106 pasien DHF Jakarta tahun 2006 untuk dijadikan sebagai kandidat antigen. Gen NS1 di amplifikasi dengan PCR untuk kemudian diklon ke dalam vektor pGEX-6P-1 dan selanjutnya diekspresikan di dalam baketri *E. coli* strain BL-21. Hasil analisis SDS-PAGE dan western blot menunjukkan bahwa protein NS1 rekombinan telah berhasil diekspresikan pada kisaran 80 kDa. Protein rekombinan Gst-NS1 telah berhasil dipurifikasi menggunakan Sephadex-G-100 serta kit Purifikasi Bulk Gst dengan kadar 21 ng/ μ L. Protein ini juga menunjukkan adanya reaktivitas dengan serum pasien dengue. Produksi protein NS1 secara rekombinan dapat menjadi alternatif untuk menyediakan antigen dalam skala besar dan aman yang dapat digunakan dalam pengembangan diagnosis infeksi dengue.

Kata kunci:

protein NS1, ekspresi protein, virus dengue

ABSTRACT

Name : Fithriyah
Study Program : Biomedical Science
Title : Production of Non Structural 1 Protein from Dengue Virus Serotype 2 Indonesian Strain As Dengue Diagnostic Reagent

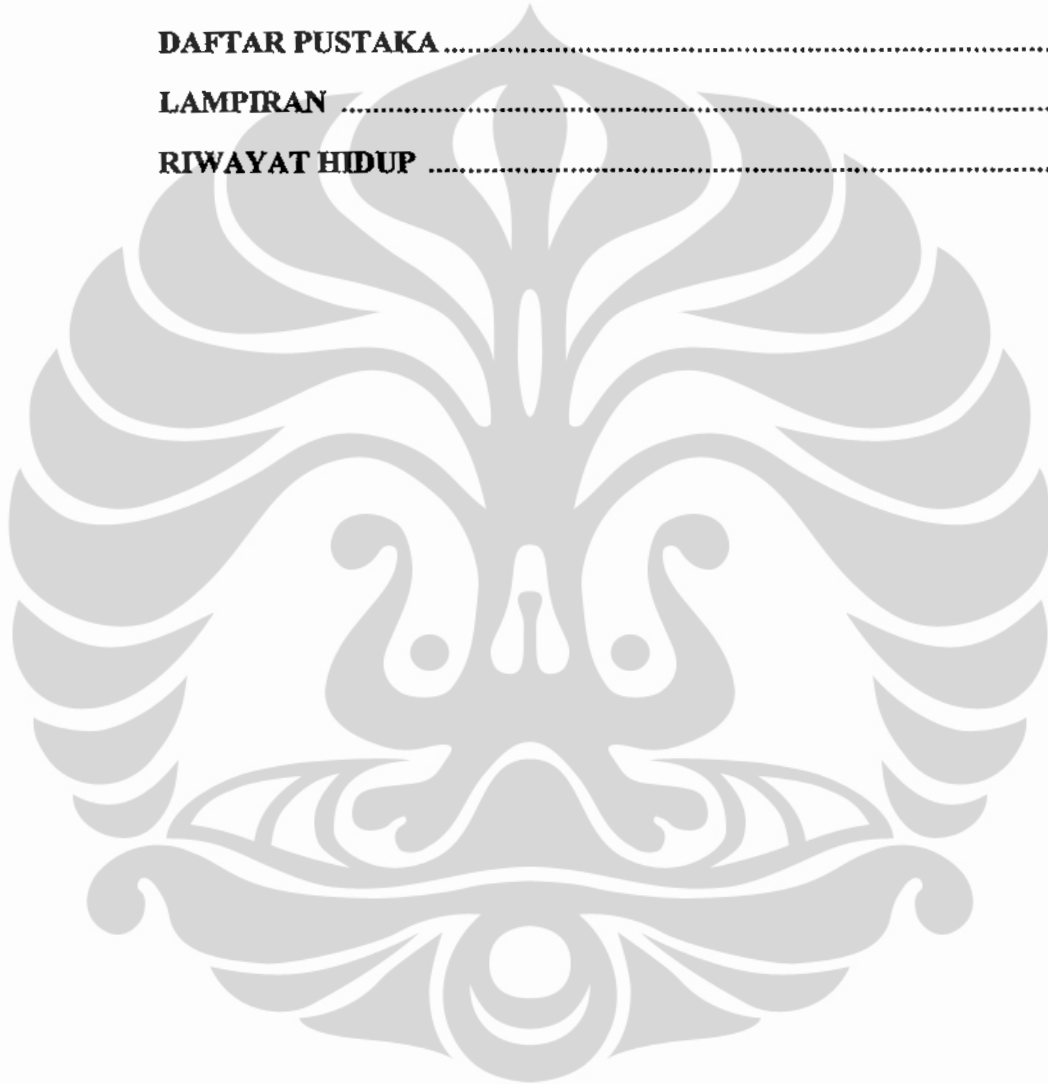
Dengue virus infection is still the major health problem in Indonesia with high CFR every year. Dengue virus has 3 structural proteins and 7 non structural proteins. It is reported that the non structural 1 (NS1) protein is immunogenic and is produced in the earlier stage of infection. This protein does not show any cross reaction so it can be a good candidate for diagnostic antigen of dengue infection. We are trying to produce a recombinant NS1 protein from DS 3106 strain which is isolated from DHF patient in Jakarta. The NS1 gene was amplified with PCR and cloned in pGEX-6P-1 systems to be expressed in *E. coli* BL21 strain. SDS-PAGE and western blot analysis showed that the recombinant NS1 was expressed in 80 kDa range. The recombinant Gst-NS1 also had been purified using Sephadex-G-100 and Bulk Gst Purification Kit with the concentration 21 ng/ μ L amount and this protein showed reactivity with dengue patient sera. NS1 production with recombinant system can be the alternative way to provide antigen safely in large scale to improve dengue diagnostic.

Key words: NS1 protein, protein expression, dengue virus

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS	ii
HALAMAN PENGESAHAN	iii
KATA PENGANTAR	iv
LEMBAR PENGESAHAN UNTUK PUBLIKASI KARYA ILMIAH.....	vi
ABSTRAK	vii
DAFTAR ISI	x
DAFTAR GAMBAR	xii
DAFTAR LAMPIRAN	xiii
1. PENDAHULUAN.....	1
1.1 Latar Belakang Penelitian	1
1.2 Tujuan Penelitian.....	3
1.3 Manfaat Penelitian.....	3
2. TINJAUAN PUSTAKA	4
2.1 Virus Dengue	4
2.1.1 Struktur fisik virus dengue	4
2.1.2 Struktur genom virus dengue	5
2.1.3 Protein struktural virus dengue.....	6
2.1.4 Protein non-struktural virus dengue.....	7
2.2 Diagnosis Infeksi Dengue	10
2.3 Pengklonaan dan Ekspresi Protein Rekombinan di <i>E. coli</i>	12
3. BAHAN DAN CARA KERJA	15
3.1 Waktu dan Tempat Penelitian	15
3.2 Strategi Penelitian.....	15
3.3 Bahan	15
3.4 Cara Kerja	16
3.4.1 Persiapan gen NS1, plasmid pGEX-6P-1 dan bakteri <i>E.coli</i>	16
3.4.2 Pengklonaan gen NS1 ke dalam plasmid pGEX-6P-1	18
3.4.3 Ekspresi protein rekombinan.....	21
3.4.4 Isolasi dan purifikasi protein Gst-NS1	23
3.4.5 <i>Dot Enzyme Immuno Assay</i>	25
4. HASIL DAN PEMBAHASAN	26
4.1 Hasil.....	26
4.1.1 Amplifikasi gen NS1	26

4.1.2 Pengklonaan gen NS1 kedalam plasmid pGEX-6P-1	27
4.1.3 Ekspresi protein rekombinan Gst-NS1	31
4.1.4 Isolasi dan purifikasi protein Gst-NS1	33
4.1.5 <i>Dot Enzyme Immuno Assay</i>	34
4.2 Pembahasan.....	35
5. KESIMPULAN DAN SARAN	40
5.1 Kesimpulan	40
5.2 Saran	40
DAFTAR PUSTAKA	41
LAMPIRAN	44
RIWAYAT HIDUP	49



DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1. Struktur virus dengue.....	5
Gambar 2.2. Struktur genom virus dengue.....	5
Gambar 2.3. Protein yang dihasilkan oleh genom virus dengue serta target utama respon imun	6
Gambar 2.4. Peta plasmid pGEX-6P-1	14
Gambar 4.1. Elektroforesis PCR produk NS1 dari cDNA DS3106	26
Gambar 4.2. Elektroforesis hasil restriksi gen NS1 dan pGEX-6P-1	28
Gambar 4.3. Elektroforesis koloni PCR hasil transformasi	29
Gambar 4.4. Elektroforesis hasil isolasi dan pemotongan pGEX-6P-1 dan pGD2NS dengan enzim <i>Bal</i> I	30
Gambar 4.5 Posisi relatif situs pemotongan enzim <i>Bal</i> I pada pGD2NS.....	30
Gambar 4.6. Analisis hasil ekspresi protein rekombinan pada SDS-PAGE 8%.....	31
Gambar 4.7. Analisis ekspresi dengan western blot menggunakan mAb anti <i>Gst</i>	32
Gambar 4.8. Analisis fraksinasi protein dengan SDS-PAGE 8%	33
Gambar 4.9. Hasil uji western blot protein <i>Gst</i> -NS1 menggunakan mAb anti <i>Gst</i>	34
Gambar 4.10. Hasil uji western blot protein <i>Gst</i> -NS1 menggunakan serum pasien	34
Gambar 4.11. Hasil uji <i>DEIA</i>	35
Gambar 4.12. Konstruksi plasmid rekombinan pGD2NS.....	36

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. Runutan nukleotida gen NS-1 plus 80 bp upstream DV2 cetakan DS3106 dibandingkan dengan gen NS-1 DV2 strain SL767 Sri Lanka (1991)	44
Lampiran 2. Runutan nukleotida plasmid pGD2NS12 dibandingkan dengan runutan nukleotida gen NS-1 plus 80 bp upstream region DV2 cetakan DS3106.....	46
Lampiran 3. Runutan asam amino pGD2NS12 dibandingkan dengan runutan asam amino gen NS-1 plus 80 bp upstream region cetakan DS3106.....	48



BAB I

PENDAHULUAN

1.1.Latar Belakang Penelitian

Demam berdarah dengue merupakan salah satu penyakit infeksi serius yang telah mewabah di Indonesia. Penyakit ini pertama kali dilaporkan di Jakarta dan Surabaya pada tahun 1968 dengan jumlah insiden yang meningkat setiap tahunnya.¹ Penderita demam berdarah dengue pada tahun 2007 mencapai 156.697 orang dengan korban meninggal 1.296 orang. Data dari Departemen Kesehatan menunjukkan dari awal tahun 2008 sampai dengan bulan Februari, Jakarta menempati urutan pertama kasus demam berdarah dengue se-Indonesia dengan 4.481 kasus.²

Infeksi virus dengue memiliki berbagai gejala klinik yang bervariasi, mulai dari yang tanpa gejala (asimtomatik), demam dengue (DD), demam berdarah dengue (DBD) hingga dengue *shock syndrome* (DSS). Gejala DD dapat berupa sakit kepala, nyeri otot dan persendian, ruam dan leukopenia. Gejala klinis yang lebih berat dari DD adalah DBD dan DSS, dimana DBD ditunjukkan dengan gejala demam tinggi, perdarahan, pembesaran hati (hepatomegali) hingga gejala kegagalan sirkulasi maupun kebocoran plasma hingga dapat menimbulkan syok dan dikategorikan sebagai DSS yang pada akhirnya dapat berakibat fatal.¹

Variasi gejala dan tingginya resiko infeksi yang dapat berakibat fatal sehingga sangat diperlukan diagnosis dini terhadap infeksi dengue yang mampu memberikan hasil yang baik. Sekarang ini telah tersedia berbagai metode deteksi infeksi dengue, dengan kelebihan dan kekurangannya. Uji hambatan hemaglutinasi (HI) merupakan uji diagnosis yang dianjurkan oleh WHO untuk dilakukan secara rutin dalam deteksi dengue karena pelaksanaannya yang mudah. Akan tetapi uji ini membutuhkan sampel serum berpasangan untuk dapat menentukan hasil dan kategori infeksi. Uji serologi yang lain yaitu *Capture IgM* atau IgG ELISA yang didasari respon IgM ataupun IgG terhadap virus dengue. Metode ini menjadi metode serologi yang banyak dipakai dengan spesifisitas dan sensitivitas yang tinggi serta mudah dilakukan. Kekurangan dari uji ELISA IgM

atau IgG yaitu tingginya hasil negatif palsu bila dilakukan di hari-hari awal infeksi. Hal ini disebabkan karena respon IgM yang muncul akibat adanya infeksi baru dapat dideteksi pada hari keempat atau kelima, diikuti oleh respon IgG. Pada deteksi IgG, kekurangan yang lain adalah kemungkinan reaksi silang^{1,3}

Uji diagnosis infeksi dengue yang lain adalah *reverse transcription-RT PCR (Real Time Polymerase Chain Reaction)*. Uji ini mendeteksi ada tidaknya virus dengue yang dapat dilakukan pada awal infeksi dan penentuan serotype virus yang menginfeksi. Akan tetapi, uji ini relatif mahal dan membutuhkan peralatan laboratorium khusus serta tenaga lab yang terlatih. Hal ini menyebabkan kesulitan apabila digunakan untuk diagnosis rutin. Uji deteksi antigen virus yang lain selain RT-PCR adalah kultur virus maupun PRNT (*Plaque Reduction Neutralization Test*) yang tentunya dapat memberikan hasil yang lebih baik dan dapat dilakukan dari awal infeksi. Seperti RT-PCR, kedua metode ini memerlukan peralatan dan tenaga laboratorium terlatih dalam kultur sel yang akan meningkatkan biaya diagnosis. Secara keseluruhan kultur virus dan PRNT kurang sesuai untuk diagnosis rutin.^{1,3}

Komponen utama dalam diagnosis infeksi dengue adalah deteksi ada tidaknya antibodi atau antigen. Dalam diagnosis antibodi anti-dengue diperlukan antigen yang pada umumnya berupa virus dengue utuh maupun protein envelope. Namun berdasarkan beberapa studi yang ada, diketahui bahwa protein non struktural 1 (NS1) virus dengue memiliki tingkat imunogenisitas yang tinggi dan dihasilkan diawal infeksi dengue sehingga dapat dijadikan alat deteksi infeksi. Selain itu, tidak ada reaksi silang pada antibodi anti NS1 sehingga dapat digunakan untuk tujuan *serotyping*. Protein ini juga tidak menunjukkan adanya reaksi silang dengan virus golongan Flavivirus lainnya sehingga tidak memberikan hasil diagnosis positif palsu.⁴⁻⁶

Kini telah tersedia kit komersial deteksi infeksi dengue yang menggunakan antigen protein NS1. Namun kit komersial yang ada ini tidak menggunakan antigen protein NS1 yang berasal dari strain virus Indonesia sehingga ada kemungkinan nilai sensitivitas kit ini kurang. Oleh karena itu diperlukan antigen NS1 rekombinan yang berasal dari strain virus Indonesia

untuk mengembangkan suatu sistem diagnostik infeksi dengue berdasarkan antigen NS1.

Berdasarkan permasalahan di atas, maka dalam penelitian ini akan dilakukan produksi antigen NS1 rekombinan yang berasal dari virus dengue strain Indonesia. Protein rekombinan yang akan dihasilkan diharapkan dapat menjadi alat deteksi infeksi dengue, yang untuk sementara berdasarkan pada deteksi antibodi anti NS1 dalam serum pasien. Dalam perkembangannya diharapkan hasil penelitian ini dapat digunakan dalam pengembangan metode diagnose infeksi dengue berdasarkan protein NS1 sehingga dapat mengurangi ketergantungan penggunaan kit komersial.

1.2 Tujuan Penelitian

Tujuan umum dari penelitian ini adalah mendapatkan antigen NS1 rekombinan virus dengue strain Indonesia serotype-2 untuk pengembangan uji diagnosis infeksi dengue menggunakan *Dot Enzyme Immuno Assay* (DEIA). Sedangkan tujuan khusus dari penelitian ini adalah pengklonaan, ekspresi dan purifikasi protein rekombinan NS1 virus dengue serotype-2 strain Indonesia pada sistem pengeksresi pGEX-6P-1 serta melihat reaktivitas protein rekombinan dengan serum pasien terinfeksi dengue.

1.3 Manfaat Penelitian

1. Protein NS1 rekombinan yang dihasilkan dapat digunakan sebagai reagen untuk uji diagnosis infeksi virus dengue.
2. Protein NS1 rekombinan yang dihasilkan dapat digunakan sebagai antigen dalam memproduksi antibodi anti-NS1.
3. Uji diagnosis infeksi dengue berdasarkan protein NS1 rekombinan yang dihasilkan dapat mengurangi ketergantungan pada kit komersial.

BAB II

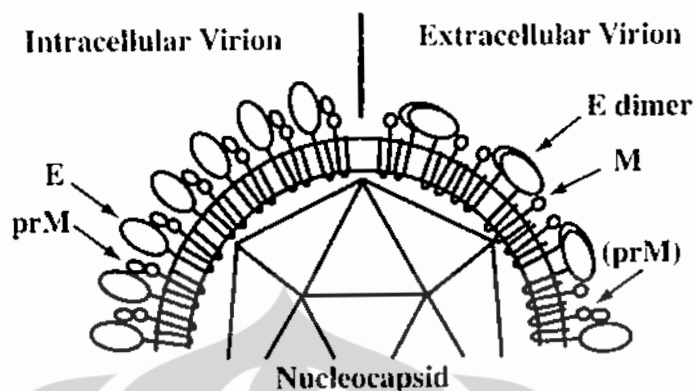
TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Virus Dengue

2.1.1 Struktur fisik virus dengue

Virus dengue adalah anggota dari genus *Flavivirus*, bagian dari famili Flaviviridae. Virus dengue memiliki 4 serotipe yaitu, DEN-1, DEN-2, DEN-3 dan DEN-4. Virus ini berukuran 40-60 nm dengan materi genetik berupa RNA positif beruntai tunggal.³

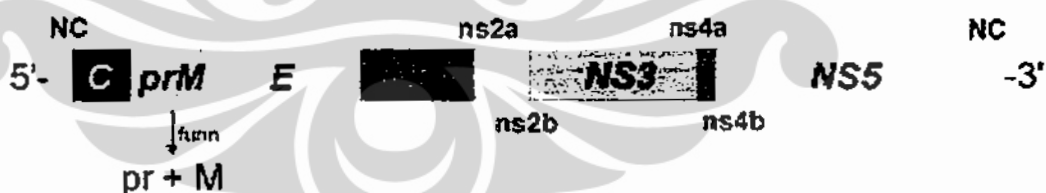
Nukleokapsid berpolarisasi positif berbentuk ikosahedral dengan diameter ~30 nm dan diselubungi oleh lipid dwilapis (*envelope*). Virion yang matang terdiri dari RNA 6%, protein 66%, karbohidrat 9%, dan lipid 17%. Protein E dan protein M tertanam dalam lipid dwilapis oleh jangkar hidrofobik C terminal. Virion yang dilepaskan juga mengandung sejumlah prekursor M yang belum diproses (prM). Oleh karena kandungan lipid yang terdapat dalam selubung, maka virus dengue dapat diinaktivasi dengan pelarut organik dan deterjen. Nukleokapsid terdiri dari protein C (*capsid*) dan RNA genom. RNA genom dapat diisolasi setelah selubung dilarutkan dengan deterjen non ionik. Partikel virus yang dikeluarkan ekstraseluler mempunyai bentuk morfologi yang tidak dapat dibedakan dengan partikel virus yang ditemukan intraseluler.⁷⁻⁹ Partikel virus yang belum matang mengandung prM yang belum diproses dan kurang infeksius dibanding virion yang dikeluarkan. Struktur virus dengue dapat dilihat pada gambar 2.1.



Gambar 2.1. Struktur virus dengue⁸

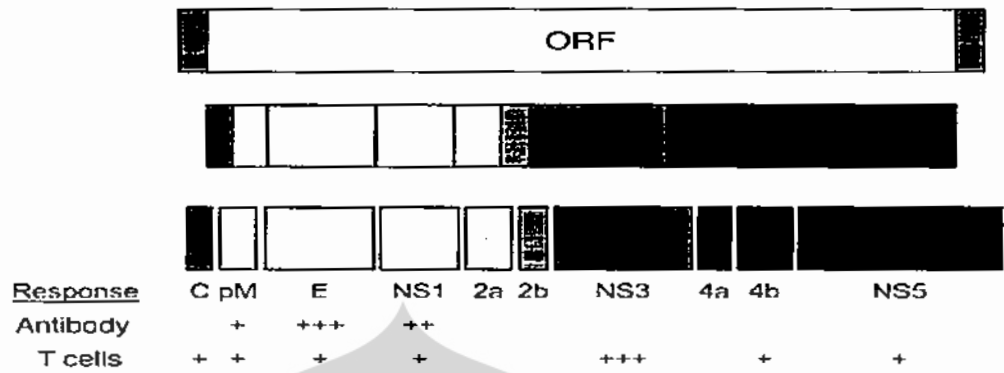
2.1.2 Struktur genom virus dengue

Genom virus dengue berupa RNA untai tunggal dengan ukuran kurang lebih 11 kb dan mengkode prekursor poliprotein dengan 3400 residu asam amino. RNA genom mempunyai *open reading frame* (ORF) yang panjang, yaitu lebih dari 10.000 basa. ORF diapit oleh *nontranslated regions* (NTR) yang terdiri dari elemen RNA yang terkonservasi (*conserved*). Genom virus dengue terdiri dari tiga gen protein struktural yang menyandi: nukleokapsid atau *core protein* (C), protein membran (prM), dan protein selubung/*envelope* (E); serta tujuh gen protein nonstruktural yaitu NS1, NS2a, NS2b, NS3, NS4a, NS4b dan NS5 (Gambar 2.2).^{1,7,10,11}



Gambar 2.2. Struktur genom virus dengue.¹¹

Keseluruhan protein nonstruktural tersebut diduga berfungsi untuk proses replikasi virus di dalam sel, hanya beberapa saja yang diketahui fungsinya secara pasti. Protein-protein yang dihasilkan oleh genom virus dengue dan protein yang menjadi target utama respon imun dapat dilihat pada gambar 2.3.^{1,7,10}



Gambar 2.3. Protein yang dihasilkan oleh genom virus dengue serta target utama respon imun.¹²

2.1.3 Protein struktural virus dengue

a. Protein C

Protein C mempunyai berat molekul 9-12 kDa, terdiri dari 112 sampai 127 asam amino yang banyak mengandung residu lisin dan arginin. Gen C yang menyandi protein C virus DEN-3 terletak pada posisi 95 sampai 434. Translasi protein dimulai dari kodon AUG pertama dari ujung 5', kecuali pada DEN-3 yang memiliki dua kodon inisiasi. Kodon AUG DEN-3 yang pertama terletak pada posisi nukleotida 95, sedangkan yang kedua pada posisi 137. Protein C merupakan protein dasar pembentuk struktur nukleokapsid. Homologi sekuens protein C pada flavivirus rendah, tetapi daerah asam amino hidrofilik dan hidrofobik bersifat terkonservasi. Protein C yang dimurnikan tidak dapat menginduksi antibodi yang dapat menetralkan virus.^{7,13,14}

b. Protein prM dan M

Gen prM terletak pada posisi nukleotida 435 sampai 934, sedangkan untuk gen M terletak pada posisi 710 sampai 934. Terdapat 2 bentuk protein M yang sudah diketahui, yaitu: (i) protein prM yang terdapat intraseluler pada virion yang belum matang dan (ii) protein M yang terdapat ekstraseluler pada virion yang matang. prM adalah glikoprotein dengan berat molekul 18,1 sampai 19,1 kDa yang merupakan prekursor protein struktural M. Pemotongan prM mengakibatkan perubahan struktur oligomer permukaan virus. Hal tersebut menyebabkan virion yang matang mempunyai

kemampuan untuk menginfeksi. Protein prM berfungsi sebagai protein *chaperon* yang melindungi protein dari kesalahan ketika proses pelipatan pada saat pematangan virion. Heterodimer prM-E diyakini berfungsi untuk melindungi protein E agar tidak mengalami perubahan konformasi yang tidak dapat kembali ke bentuk asal (*irreversible*) dalam kompartemen jalur sekresi yang bersifat asam. Pada virion yang matang, sebagai pengganti heterodimer prM-E, dua protein E berasosiasi untuk membentuk suatu homodimer. Perubahan konformasi yang tidak dapat kembali ke bentuk asal selama fusi dapat mengubah homodimer E menjadi trimer. Protein prM rekombinan dapat menginduksi sistem imun.^{13,14}

c. Protein E

Protein E mempunyai berat molekul 55-60 kDa dengan 494 sampai 501 asam amino, disandi oleh gen E yang terletak pada posisi nukleotida 935 sampai 2416. Protein E adalah protein utama selubung virion dan mempunyai peran kunci dalam sejumlah proses penting seperti perakitan virion, pengikatan reseptor, hemaglutinasi eritrosit dan fusi membran. Protein E juga merupakan target utama antibodi netralisasi. Jika terjadi mutasi pada protein tersebut, maka akan mengubah patogenesis virus dengue. N-terminal protein E disusun oleh asam amino *Met-Arg-X-Val-Gly-Val-Gly-Asn-Arg-Asp-Phe-Val*. Terdapat dua sisi glikosilasi pada protein E virus dengue, yaitu pada posisi *Asn-67* dan *Asn-153*. Pada virus DEN-2 glikosilasi hanya pada posisi *Asn-67*, sedangkan pada DEN-1 baik pada posisi *Asn-67* maupun *Asn-153*. Motif reseptor glikosilasi DEN-3 diperkirakan serupa dengan DEN-1, sedangkan glikosilasi DEN-4 mirip dengan DEN-2. Tidak ada korelasi antara status glikosilasi protein E dan pengenalan epitop oleh antibodi monoklonal.^{7,13,14}

2.1.4 Protein non-struktural virus dengue

a. Protein NS1

Protein NS1 adalah glikoprotein dengan berat molekul 42-50 kDa, terdiri dari 353-354 asam amino. Gen NS1 yang menyandi protein NS1 pada

virus DEN-3 terletak pada posisi nukleotida 2417 sampai 3466. Glikoprotein NS1 terdapat di dalam sel, permukaan sel atau ekstraseluler. NS1 mengandung 12 residu sistein yang sangat terkonservasi demikian juga ketiga situs glikosilasinya. Semua flavivirus setidaknya memiliki satu situs glikosilasi pada posisi 208-209. NS1 disekresikan secara perlahan dari sel mamalia dan tidak disekresikan dari sel nyamuk. Protein NS1 yang terdapat dipermukaan sel mempunyai bentuk yang berbeda dengan yang disekresikan ke media ekstraseluler. Bentuk dimer protein NS1 terdapat baik pada cairan intraseluler maupun ekstraseluler sel yang terinfeksi virus. Bentuk dimer tersebut diyakini sebagai bentuk fungsional protein NS1. Fungsi protein NS1 pada replikasi virus belum diketahui dengan pasti, tetapi diperkirakan berperan dalam pematangan virion karena NS1 berasosiasi dengan protein E yang belum matang dalam lumen retikulum endoplasma. Studi dengan virus mutan menunjukkan bahwa NS1 berperan pada fase awal replikasi. Mutasi pada gen yang menyandi protein NS1 dapat mempengaruhi virulensi virus.^{7,13,14}

b. Protein NS3

Protein NS3 adalah protein virus terbesar kedua, mempunyai berat molekul 67-70 kDa dengan 618-623 asam amino yang sangat dikonservasi pada semua flavivirus. Gen penyandi protein NS3 virus DEN-3 terletak pada posisi nukleotida 4517 sampai 6373. NS3 merupakan komponen enzimatik mesin replikasi RNA, yaitu sebagai protease serin dan helikase. Perbandingan sekuens dan analisis biokimia memperlihatkan bahwa kemungkinan NS3 memiliki fungsi protease dan helikase. Daerah di dekat N-terminal NS3 memperlihatkan homologi struktur dan sekuens dengan bagian aktif protease serin dari superfamili tripsin. Kombinasi daerah tersebut dengan NS2b diperlukan untuk proses proteolitik pada virus. Daerah NS3 yang lain berbagi homologi dengan superfamili helikase RNA, yang mengandung motif pengikatan nukleotida purin. Studi menunjukkan bahwa daerah C-terminal NS3 mungkin terlibat dalam *capping* dan metilasi RNA virus.^{7,13,14}

c. Protein NS5

Protein NS5 mempunyai berat molekul 104-106 kDa dengan 900 sampai 905 asam amino dan sangat lestari. Gen penyandi protein NS5 virus DEN-3 terletak pada posisi nukleotida 7568 sampai 10267. NS5 diyakini merupakan polimerase RNA. Bagian sekuen yang dikonservasi pada daerah C-terminal mengandung motif *Gly-Asp-Asp* yang mirip dengan yang ada pada polimerase RNA virus RNA untai positif lainnya. Bagian N-terminal NS5 (antara residu 60 dan 145) homolog dengan daerah metiltransferase yang berimplikasi pada pengikatan adenosilmetionin-S. Diperkirakan bahwa bagian tersebut terlibat dalam metilasi struktur *cap 5'*. Pada saat ini protein NS5 mempunyai dua fungsi, yaitu aktivitas metiltransferase dan polimerase RNA.^{7,13,14}

d. Protein NS2a, 2b, 4a dan 4b

NS2a, NS2b, NS4a dan NS4b adalah protein nonstruktural yang kecil. Sekuens keempat protein tersebut tidak lestari, tapi mempunyai profil hidrofobisitas yang terkonservasi pada sesama flavivirus. Oleh karena itu diperkirakan keempat protein tersebut adalah protein yang berasosiasi dengan membran. NS2a mempunyai berat molekul 18-22 kDa dengan 218-231 asam amino, diperlukan untuk memproses C-terminal NS1. NS2b mempunyai berat molekul 13-15 kDa dengan 130-132 asam amino, terlibat dalam fungsi protease dari kompleks NS2b-NS3. 40 asam amino pada bagian hidrofilik NS2b penting untuk aktivitas protease kompleks NS2b-NS3. Fungsi biologi yang spesifik untuk NS4a yang mempunyai berat molekul 16-16,4 kDa dengan 149 -150 asam amino dan NS4b yang mempunyai berat molekul 27-28 kDa dengan 248-256 asam amino belum diketahui. Kedua protein tersebut mungkin terlibat dalam lokalisasi membran kompleks NS3 dan NS5 melalui interaksi protein-protein. Gen penyandi protein NS2a virus DEN- 3 terletak pada posisi nukleotida 3467 sampai 4125, sedangkan gen penyandi protein NS2b terletak pada posisi nukleotida 4126 sampai 4516. Gen NS4a virus DEN-3 terletak pada posisi nukleotida 6374 sampai 6823, sedangkan gen NS4b pada posisi nukleotida 6824 sampai 7567.^{13,14}

2.2 Diagnosis Infeksi Dengue

Diagnosis infeksi dengue pada dasarnya dibagi atas dua metode yaitu diagnosis berdasarkan antigen dan diagnosis berdasarkan respons antibodi pasien. Kedua metode ini memiliki kelebihan dan kekurangannya masing-masing dan penggunaannya disesuaikan dengan tujuannya.

Diagnosis infeksi berdasarkan antigen sangat berkaitan dengan jumlah dan perjalanan antigen di dalam tubuh pasien. Dalam infeksi dengue diagnosis infeksi berdasarkan antigen dapat dilakukan dari hari awal infeksi hingga hari ke-3 atau ke-5 perjalanan penyakit yang ditandai dengan masa demam pasien sebagai gambaran tingkat viremia. Sedangkan diagnosis berdasarkan respons antibodi pasien baru bisa dilakukan saat perjalanan penyakit memasuki hari ke-4 atau ke-5, saat respons Ig-M muncul pertama kali, sehingga pelaksanaannya tidak bisa dilakukan sedini diagnosis infeksi berdasarkan antigen.⁴ Berbagai metode diagnosis infeksi dengue antara lain:

a. *Reverse Transcription-PCR*

Reverse Transcription-PCR (RT-PCR) merupakan suatu metode molekuler deteksi infeksi dengue berdasarkan ada tidaknya materi genetik virus di dalam suatu spesimen. Materi genetik virus dengue yang berupa RNA mengalami reaksi transkripsi balik menggunakan primer spesifik menjadi cDNA yang kemudian dideteksi. Walaupun metode ini memiliki tingkat sensitivitas dan spesifisitas tinggi namun pelaksanaannya sulit untuk dilakukan secara rutin karena membutuhkan biaya besar dan keahlian serta dan peralatan laboratorium yang khusus.^{3,15}

b. *Real-Time RT-PCR*

Seperti halnya dengan RT-PCR metode *Real-Time RT-PCR* juga didasari oleh ada tidaknya materi genetik virus dengue dalam spesimen. Hanya saja metode ini mendeteksi ada tidaknya materi genetik secara langsung melalui komputerisasi dan bisa menggambarkan secara tidak langsung *viral load* dari spesimen tersebut. Metode ini memiliki tingkat sensitivitas dan spesifisitas yang tinggi namun tidak rutin untuk digunakan

terkait dengan biaya pelaksanaan yang besar dan membutuhkan keahlian serta peralatan laboratorium yang khusus.¹⁵

c. Biakan dan isolasi virus

Biakan dan isolasi virus merupakan metode konvensional deteksi infeksi berdasarkan antigen sebelum metode molekuler ditemukan. Metode ini diawali dengan mengisolasi virus dari spesimen dengan memisahkannya dari komponen seluler lain untuk kemudian di kultur di dalam sel nyamuk maupun sel mamalia. Ada tidaknya pertumbuhan virus dilakukan melalui pengamatan langsung dengan mikroskop. Metode ini sekarang mulai jarang digunakan karena memerlukan sarana kultur sel yang membutuhkan biaya cukup besar serta memerlukan waktu yang panjang.³

d. Inhibisi Hemaglutinasi

Metode ini didasari respons antibodi pasien dalam serum dan menjadi metode standar baku emas yang ditetapkan oleh WHO karena pelaksanaannya yang mudah dan tidak membutuhkan biaya besar. Hanya saja metode ini membutuhkan serum ganda yang diambil dari fase akut dan fase konvalesen untuk dapat memberikan interpretasi diagnosis infeksi.^{3,16}

e. *Dot Enzyme Immuno Assay* (DEIA)

Metode ini dapat digunakan untuk mendeteksi antigen maupun antibodi dalam serum pasien. Hasil positif ditunjukkan dengan terbentuknya *dot* atau titik pada membran uji. Deteksi yang dipilih ditentukan oleh reagen yang direkatkan pada membran uji. Metode ini tergolong mudah pelaksanaannya dan tidak membutuhkan biaya yang besar sehingga dapat dijadikan deteksi cepat infeksi dengue.¹⁷

f. ELISA

Metode yang kini umum digunakan dalam diagnosis infeksi dengue adalah ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbant Assay*) yang didasari oleh reaksi antigen-antibodi. Metode ini dapat digunakan untuk mendeteksi

antigen maupun antibodi dalam serum pasien. Hasil positifnya diperoleh dari nilai absorbansi reaksi yang lebih tinggi dibandingkan nilai *cut-off* serum kontrol orang sehat.⁶ Metode ini mudah pelaksanaannya akan tetapi kit komersial yang telah ada masih diproduksi oleh negara maju sehingga harganya relatif mahal.

Berbagai metode deteksi infeksi dengue yang ada pada umumnya menggunakan reagen virus dengue utuh sebagai antigen reaksi. Pada saat ini beberapa studi menunjukkan bahwa protein E dan NS1 dapat dijadikan alternatif antigen reaksi dengan hasil uji yang baik dalam mendeteksi infeksi dengue dan penentuan infeksi primer maupun sekunder. Akan tetapi protein E menunjukkan adanya reaksi silang dengan virus lain yang berasal dari golongan Flavivirus lainnya serta sifatnya yang mudah bermutasi. Sedangkan protein NS1 tidak menunjukkan adanya reaksi silang dan pada suatu studi protein ini juga digunakan untuk tujuan seroepidemiologi. Protein ini dihasilkan pada fase akut infeksi dengue dan antibodi anti-NS1 yang terbentuk diharapkan sebanding dengan jumlah protein yang dihasilkan pada fase tersebut. Protein ini juga cenderung bersifat lestari pada setiap serotipe dengue sehingga dapat dijadikan kandidat antigen yang baik dalam diagnosis infeksi dengue.⁴⁻⁶

2.3 Pengklonaan dan Ekspresi Protein Rekombinan di *Eschericia coli*

Pengklonaan atau kloning berasal dari bahasa Yunani *κλών* (klon) yang berarti “kembar” yang menunjukkan proses terbentuknya tanaman baru dari bagian tanaman induk. Istilah ini kemudian meluas penggunaannya tidak terbatas di dunia hortikultura dan kini lazim digunakan dalam dunia molekuler. Pengklonaan molekuler mengacu pada perbanyakan suatu sekuens DNA secara *in-vivo*. Teknologi ini kini digunakan untuk percobaan biologik maupun aplikasi praktis, diantaranya dalam produksi suatu protein rekombinan berskala besar.¹⁸

Secara garis besar, proses pengklonaan molekuler melalui 4 tahap yaitu: pemotongan (restriksi), penyambungan (ligasi), pemindahan (transfeksi) dan penseleksian rekombinan. Suatu sekuens DNA yang hendak diperbanyak disisipkan kedalam suatu vektor untuk kemudian dimasukkan ke dalam sel inang

untuk kemudian diperbanyak sejalan dengan proses pembelahan (mitosis) sel inang.¹⁸

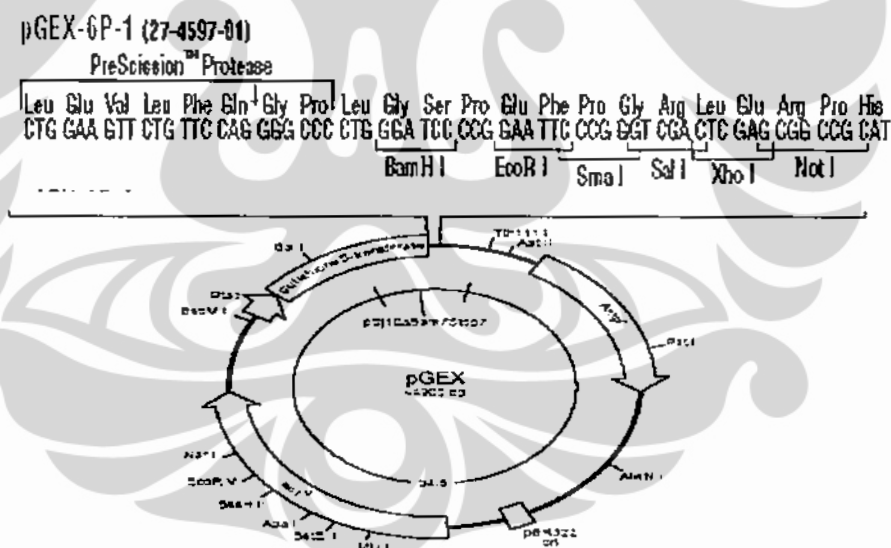
Vektor yang banyak digunakan dalam pengklonaan molekuler adalah plasmid. Plasmid merupakan molekul DNA sirkuler yang berukuran kecil dan dapat bereplikasi secara mandiri dalam sel bakteri. Hal ini disebabkan karena plasmid memiliki *origin of replication*. Vektor plasmid juga memiliki gen yang mengkode resistensi terhadap antibiotik (contohnya resistensi terhadap ampisilin), sehingga bakteri yang mengandung plasmid dapat diseleksi. Vektor plasmid umumnya terdiri dari 2-4 kb sekuen DNA. Agar fragmen DNA sisipan dapat diklon ke dalam suatu plasmid, maka fragmen ini diligasikan pada situs restriksi yang sesuai pada vektor. Kemudian molekul rekombinan yang dihasilkan ditransformasikan ke dalam sel *E.coli*. Bakteri yang memiliki plasmid kemudian dapat ditumbuhkan dalam jumlah besar dan dilakukan ekstraksi DNA. Molekul plasmid DNA sirkuler dapat dipisahkan dari DNA kromosom bakteri sehingga akan dihasilkan DNA plasmid murni yang dapat digunakan untuk analisa sisipan klon.¹⁸

Salah satu plasmid yang digunakan dalam pengklonaan molekuler adalah plasmid pGEX yang dirancang untuk ekspresi gen atau fragmen gen yang difusikan dengan GST (Glutathione S-Transferase) dari *Schistosoma japonicum*. GST merupakan protein yang secara alami terdapat di alam dengan berat kurang lebih 26 kDa. GST umumnya digunakan untuk menghasilkan protein fusi. GST yang berfungsi sebagai "tag" ini terdiri dari 220 asam amino, lebih besar jika dibandingkan dengan "tag" yang lain seperti myc-tag FLAG-tag. GST difusikan dengan protein pada ujung amino (*N-terminus*).¹⁹

Plasmid pGEX-6P-1 memiliki promotor *tac* yang diperlukan untuk tingkat ekspresi protein yang tinggi. Sedangkan gen internal *lac I^f* pada semua galur *E.coli* digunakan untuk melepaskan protein fusi (purifikasi) dari matriks afinitas. Akan tetapi hal ini akan mengurangi fungsi antigenisitas dan fungsional protein fusi tersebut. Plasmid pGEX-6P-1 juga memiliki situs pemotongan protease (Protease Precision Site) yang berfungsi untuk memotong protein yang diinginkan dari protein fusi.¹⁹

Protein yang diekspresikan dari plasmid pGEX-6P-1 dihasilkan di bawah kontrol promotor *tac*, yang diinduksi dengan analog laktosa yaitu *isopropyl β-D-thiogalactoside* (IPTG). Kultur bakteri yang telah diinduksi kemudian akan mengekspresikan protein fusi GST setelah beberapa jam. Sel-sel bakteri kemudian dipanen dan dilisiskan dengan sonikasi yang ringan. Supernatan bakteri kemudian dipisahkan dari debris sel dengan sentrifugasi dan supernatan yang telah bersih dapat diaplikasikan ke matriks Glutathione Sepharose 4B. Dengan matriks Glutathione Sepharose 4B maka protein fusi dapat dipurifikasi hingga lebih dari 90% dengan satu langkah kromatografi.^{20,21}

Setelah protein fusi terikat dengan matriks, maka protein ini dicuci dengan dapar pencuci untuk menghilangkan protein-protein non spesifik yang terikat dengan matriks. Kemudian protein fusi dapat dipisahkan dari matriks dengan kondisi elusi ringan (10 mM glutathione) yang menjaga sifat antigenisitas dan aktivitas fungsional protein tersebut.^{20,21}



Gambar 2.4. Peta plasmid pGEX-6P-1.²¹

BAB III BAHAN DAN CARA KERJA

3.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi, Departemen Mikrobiologi, FKUI mulai bulan April 2007 hingga November 2008.

3.2 Strategi Penelitian

Penelitian ini dilakukan dengan berbagai tahapan kerja, meliputi: (i) amplifikasi gen NS1 dari cDNA virus dengue serotipe-2 koleksi Departemen Mikrobiologi; (ii) pengklonaan gen NS1 virus dengue serotipe-2 ke dalam vektor ekspresi; (iii) ekspresi protein rekombinan; (iv) purifikasi protein rekombinan; dan terakhir (v) *Dot Enzyme Immunoasay*.

3.3 Bahan

a. cDNA virus dengue serotipe-2

Pada penelitian ini digunakan cDNA virus dengue serotipe-2 strain DS-3106 koleksi Departemen Mikrobiologi FKUI yang berasal dari pasien DHF di Jakarta tahun 2006. Berdasarkan *Reverse Transcription-PCR* diketahui pasien tersebut terinfeksi virus dengue serotipe 2.

b. Primer

Pasangan primer yang digunakan merupakan pasangan primer *sense* dan *anti-sense* spesifik terhadap ORF NS1 dengan penambahan amplifikasi 80 pb bagian *upstream* gen NS1. Pasangan primer yang digunakan adalah:

1. d2-2329sBam : 5'-CGC GAG GAT CCT GGA TAG GAA TGA ATTC ACGC-3'
2. d2-NS1-350cSal : 5'-TCC GCT GTC GAC TCA GGC TGT GAC CAA GGA GTT-3'

Kedua primer di desain memiliki situs restriksi, *Bam*H1 pada primer *forward* dan *Sal*1 pada primer *reverse*. Desain primer dilakukan menggunakan software GENETYX-WIN *version* 5.1.1 tahun 2001.

c. Vektor

Vektor yang digunakan dalam penelitian ini adalah vektor plasmid pGEX-6P-1 (Amersham Pharmacia Biotech, 1997) yang memiliki situs restriksi *Bam*H1 dan *Sal*I (Gambar 2.4).

d. Galur bakteri

Dalam penelitian ini digunakan bakteri *Escherichia coli* galur TOP10 dan BL21 dari Amersham Pharmacia Biotech, 1997. Galur TOP10 digunakan dalam propagasi plasmid sedangkan galur BL21 digunakan dalam ekspresi protein. Kedua galur ditumbuhkan dalam media Luria Bertani (LB) agar dan cair mengandung ampicillin 60 µg/mL.

3.4 Cara Kerja

3.4.1 Penyiapan gen NS1, plasmid pGEX-6P-1 dan bakteri kompeten TOP10 dan BL21

a. Amplifikasi gen NS1

Amplifikasi gen NS1 dilakukan dengan teknik *Polymerase Chain Reaction* (PCR) menggunakan pasangan primer yang telah disebutkan diatas. Campuran reaksi yang digunakan adalah: 10x dapar PCR, 10 mM campuran dNTP, 50 mM MgCl₂, 200 nM primer *forward* d2-2329s*Bam*, 200 nM primer *reverse* d2-ns1-2350c*Sal* dan enzim Platinum Taq *Polymerase* (Invitrogen) serta cetakan cDNA DS 3106.

Siklus suhu yang digunakan adalah denaturasi awal pada 95 °C selama 5 menit, denaturasi pada 95 °C selama 45 detik, *Annealing* pada 52 °C selama 30 detik, ekstensi pada 72 °C selama 90 detik dan ekstensi final pada 72 °C selama 7 menit, dengan pengulangan sebanyak 40 siklus. Amplifikasi dilakukan pada *Mastercycler Gradient* (Eppendorf).

Amplikon DNA yang dihasilkan dianalisis menggunakan elektroforesis jel agarose 0,8% dilanjutkan dengan visualisasi menggunakan etidium bromide (EtBr). Amplikon kemudian dimurnikan menggunakan *High Pure PCR Product Purification Kit* (Roche Applied Science).

b. Isolasi plasmid pGEX-6P-1

Plasmid pGEX-6P-1 diisolasi dari bakteri *E. coli* galur TOP10 menggunakan metode ekstraksi fenol-kloroform.²² Bakteri *E. coli* pembawa plasmid ditumbuhkan dalam 10 mL medium LB cair yang telah mengandung ampisilin 60 µg/ml selama 16 jam. Pada masa ini bakteri akan mencapai pertumbuhan fase *lag*. Selanjutnya dilakukan *pelleting* bakteri di dalam tabung mikro melalui pemusingan 5.000 rpm selama 10 menit. Supernatan yang dihasilkan dibuang. Ke dalam pellet bakteri ditambahkan 300 µL larutan P1 (25 mM Tris, 10 mM EDTA dan 100 ng/ml RNase), kemudian dilakukan resuspensi pelet dan inkubasi pada suhu 37 °C selama 5 menit. Setelah itu ditambahkan 600 µL larutan P2 (200 mM NaOH dan 1% SDS) dilanjutkan dengan membolak-balik campuran sebanyak 5 kali. Campuran kemudian ditambah dengan 450 µL larutan P3 (3 M Potasium Asetat) yang juga dilanjutkan dengan membolak-balik campuran sebanyak 5 kali. Kemudian dilakukan pemusingan campuran pada suhu 4°C dengan kecepatan 8.000 rpm selama 10 menit.

Supernatan yang terbentuk kemudian diambil dan ditempatkan pada tabung mikro baru, sedangkan pelet dibuang. Proses selanjutnya adalah ekstraksi fenol kloroform. Supernatan ditambahkan dengan larutan fenol : kloroform : isoamilalkohol (25:24:1) dengan perbandingan 1:1. Larutan dicampur kuat (*vortex*) dan dilakukan pemusingan pada kecepatan 12.000 rpm selama 10 menit. Hasil dari pemusingan ini adalah terbentuknya 2 fase. Fase air yang terletak pada bagian atas diambil dan ditempatkan pada mikro baru.

Fase air yang dipisahkan kemudian ditambah dengan larutan etanol absolut dingin, dengan perbandingan volume fase air dengan etanol adalah 1:2,5. Larutan ini kemudian divortex dan dipusing kembali dengan kecepatan 12.000 rpm selama 15 menit. Supernatan yang terbentuk kemudian dibuang. Pelet yang tersisa kemudian ditambah dengan larutan etanol 70% untuk kemudian divorteks dan disentrifus kembali pada suhu 4 °C selama 5 menit. Supernatant yang terbentuk dibuang kembali hingga menyisakan pellet plasmid yang kemudian dikeringkan dengan DNA *Speed Vac* (Savant) selama 10-15 menit hingga tidak ada cairan dalam tabung mikro. Setelah benar-benar

kering, plasmid diresuspensi dengan 1/3 dapar TE (Tris EDTA). Hasil dari isolasi plasmid ini kemudian dianalisis dengan elektroforesis jel agarose 0,8%.

c. Persiapan bakteri *E.coli* kompeten galur TOP10 dan BL21

Bakteri kompeten *E.coli* galur TOP10 dan BL21 dipersiapkan untuk transformasi plasmid rekombinan. Masing-masing galur ditumbuhkan pada media LB agar dan diinkubasi pada 37 °C selama 18 jam. Setelah inkubasi, di subkultur kembali pada media LB cair dilanjutkan dengan inkubasi pada *rotary shaker* dengan kecepatan 200 rpm, 37 °C selama 18 jam. Setelah inkubasi, dilakukan subkultur pada media LB cair yang baru dengan absorbansi awal sebesar 0,01 pada $\lambda = 600$ nm. Inkubasi dilanjutkan dengan *Rotary shaker* dengan kecepatan 200 rpm, 37 °C hingga kultur mencapai absorbansi 0,5 pada $\lambda = 600$.

Pertumbuhan bakteri kemudian dihambat dengan menginkubasi kultur di dalam es selama 20 menit. Dilanjutkan dengan *pelleting* bakteri melalui pemusingan pada 5.000 rpm selama 20 menit. Supernatan yang dihasilkan kemudian dibuang, pellet yang tersisa diresuspensi dengan larutan 0,05 M CaCl₂ dingin dan diinkubasi selama 30 menit. Dilanjutkan dengan pemusingan larutan dengan kecepatan 5.000 rpm selama 20 menit, supernatan yang dihasilkan kemudian dibuang. Pelet yang tersisa kemudian diresuspensi kembali dengan larutan 0,05 M CaCl₂ dan gliserol dengan konsentrasi akhir 10%. Pellet kemudian dibekukan dengan nitrogen cair, lalu disimpan pada suhu -80 °C sampai digunakan.

3.4.2 Pengklonaan gen NS1 ke dalam plasmid pGEX-6P-1

a. Pemotongan gen NS1 dan plasmid pGEX-6P-1 dengan enzim restriksi

Gen NS1 dan plasmid pGEX-6P-1 yang telah disiapkan sebelumnya dipotong menggunakan enzim restriksi endonuklease *Bam*H1 dan *Sal*1 (Promega). Pemotongan dilakukan dengan campuran reaksi 10x dapar *multicore*, enzim *Bam*H1, enzim *Sal*1 serta air suling yang kemudian ditambahkan gen NS1 untuk restriksi insert atau pGEX-6P-1 untuk restriksi

plasmid. Campuran kemudian diinkubasi pada suhu 37 °C selama 2 jam dan reaksi dihentikan melalui pemanasan pada suhu 65 °C selama 15 menit. Gen NS1 dan plasmid pGEX-6P-1 yang telah direstriksi kemudian dipurifikasi menggunakan *QIAquick Gel Extraction Kit* (Qiagen).

b. Ligasi gen NS1 dengan plasmid pGEX-6P-1

Prosedur ligasi dilakukan sesuai dengan prosedur.²² Perbandingan gen NS1 dengan plasmid pGEX-6P-1 adalah 3:1. Reaksi dilakukan dengan campuran 10x dari *T4 DNA Ligase*, enzim *T4 DNA Ligase* (Promega) dan air suling. Reaksi ligasi dilakukan pada suhu 16 °C selama 3 jam. Ligasi berjalan melalui penyisipan gen NS1 ke *multiple cloning site* plasmid pGEX-6P-1 diantara situs restriksi *Bam*H1 dan *Sal*I.

c. Transformasi hasil ligasi

Hasil ligasi ditransformasikan ke dalam *E.coli* galur TOP10 untuk perbanyak plasmid rekombinan. Prosedur transformasi dilakukan dengan metode *heat-shock* CaCl₂.²²

Sebanyak 30 ng hasil ligasi dicampurkan ke dalam bakteri kompeten dan diinkubasi didalam es selama lebih kurang 1 jam. Kemudian dilakukan kejut panas dengan menginkubasi campuran pada suhu 42 °C selama 90 detik dan dengan segera menginkubasi kembali larutan kedalam es selama 5 menit. Campuran kemudian diinokulasi dalam media LB cair tanpa ampicillin dan diinkubasi pada *rotary shaker* dengan kecepatan 200 rpm, 37 °C selama 1 jam. Kultur kemudian dipusing pada 5.000 rpm selama 10 menit, supernatant yang dihasilkan kemudian dibuang dan pellet yang tersisa kemudian disebar pada media LB agar mengandung 60 µg/mL ampicillin dan diinkubasi pada suhu 37 °C selama 18 jam.

d. Identifikasi klon pembawa plasmid rekombinan

Koloni bakteri yang tumbuh setelah transformasi plasmid rekombinan diidentifikasi keberadaan dan kebenaran orientasi sisipan melalui PCR koloni,

isolasi dan pemotongan plasmid dengan enzim serta sekuensing plasmid rekombinan.

d.1 PCR koloni

Metode PCR koloni dilakukan selain menggunakan primer spesifik gen NS1 sesuai reaksi di atas serta dengan mengganti salah satu primer insert dengan primer plasmid pGEX-6P-1, dalam reaksi ini mengganti primer *reverse* gen NS1 dengan primer *reverse* pGEX-6P-1 yang berada di luar daerah *multiple cloning site* plasmid. Reaksi dan siklus PCR sesuai dengan reaksi amplifikasi gen NS1 virus dengue serotipe 2 dari template DS3106. Template koloni ditambahkan ke dalam campuran reaksi PCR menggunakan tusuk gigi steril

d.2 Isolasi plasmid rekombinan

Identifikasi keberadaan dan kebenaran orientasi insert dilanjutkan dengan mengisolasi plasmid dari koloni dengan hasil PCR positif. Koloni yang memberikan hasil positif ditumbuhkan ulang pada media LB agar mengandung 60 µg/mL ampicillin dengan menggunakan tusuk gigi steril dan diinkubasi pada suhu 37 °C selama 18 jam. Koloni yang tumbuh disubkultur kembali ke dalam media LB cair mengandung 60 µg/mL ampicillin dan diinkubasi dengan *rotary shaker* pada suhu 37 °C selama 18 jam. Pertumbuhan kultur kemudian dilanjutkan dengan isolasi plasmid sesuai dengan metode fenol-kloroform.²² Plasmid yang diperoleh kemudian dianalisis menggunakan elektroforesis jel agarose 0,8% beserta plasmid pGEX-6P-1 *wild type* dilanjutkan dengan visualisasi menggunakan EtBr.

d.3 Pemotongan plasmid rekombinan dengan restriksi enzim

Konfirmasi dilanjutkan dengan pemotongan plasmid menggunakan enzim restriksi *Bal1*. Enzim ini memiliki masing-masing 1 situs pemotongan pada plasmid pGEX-6P-1 dan gen NS1, sehingga apabila gen NS1 berhasil tersisip dengan orientasi yang benar akan dihasilkan 2 potongan pita DNA berukuran 5.287 pb dan 846 pb pada visualisasi jel agarose 0,8%. Restriksi dilakukan dengan campuran reaksi 10x dapar R, enzim *Bal1* (Fermentas), air suling, plasmid rekombinan pGDNS dan plasmid pGEX-6P-1 *wild type* sebagai kontrol. Campuran kemudian

diinkubasi pada suhu 37 °C selama 2 jam dan reaksi dihentikan melalui pemanasan pada suhu 65 °C selama 15 menit. Hasil restriksi kemudian dianalisis dengan elektroforesis jel agarosa 0,8% dilanjutkan dengan visualisasi menggunakan EtBr.

d.4 Sekuensing plasmid rekombinan

Plasmid yang menunjukkan hasil restriksi positif dikonfirmasi lebih lanjut dengan sekuensing. Sekuensing dilakukan di Lembaga EJKMAN. Hasil sekuensing dianalisis dengan software GENETYX-WIN *version* 5.1.1 tahun 2001 untuk melihat arah orientasi sisipan dan kebenaran urutan asam-amino.

3.4.3 Ekspresi protein rekombinan

a. Ekspresi protein Gst-NSI

Plasmid rekombinan yang sudah dikonfirmasi keberadaan dan kebenaran orientasi insert kemudian disebut pGD2NS, ditransformasikan ke dalam bakteri *E.coli* strain BL21 untuk ekspresi protein rekombinan. Transformasi berlangsung dengan metode *heat-shock* CaCl_2 .²² Koloni yang tumbuh kemudian disubkultur ke dalam media LB agar mengandung 60 µg/mL ampisillin dan diinkubasi pada suhu 37 °C selama 18 jam. Koloni dengan pertumbuhan positif kemudian disubkultur kembali pada media LB cair mengandung 60 µg/mL ampisillin dan diinkubasi pada rotary shaker dengan kecepatan 200 rpm, suhu 37 °C selama 18 jam.

Setelah inkubasi, dilakukan subkultur pada media LB ampisillin cair yang baru dengan absorbansi awal sebesar 0,01 pada $\lambda = 600$ nm. Inkubasi dilanjutkan dengan *rotary shaker* dengan kecepatan 200 rpm, 37 °C hingga kultur mencapai absorbansi 0,5 pada $\lambda = 600$ yang dicapai setelah lebih kurang 3 jam inkubasi. Pada kondisi ini ditambahkan induser IPTG (*isopropyl-β-D-thiogalactoside*) yang telah dioptimasi dengan konsentrasi akhir 0,1 mM dan waktu inkubasi 4 jam. Sebagai kontrol, digunakan pula dari *E. coli* galur BL21 *wild type* dan *E. coli* galur BL21 yang membawa plasmid pGEX-6P-1 *wild type* dengan dan tanpa induksi IPTG serta *E. coli* galur BL21 pembawa pGDNS tanpa induksi IPTG. Ekspresi dihentikan dengan menginkubasi kultur di dalam

es selama lebih kurang 30 menit. Untuk menghindari konsentrasi bakteri yang berbeda dari masing-masing kultur yang akan memberi pengaruh pada jumlah protein, sebelum dilakukan analisis ekspresi seluruh sampel kultur yang diambil distandarisasi menjadi $OD_{600} = 1,0$. Sel kemudian dipanen dengan cara pemusingan pada kecepatan 5.000 rpm selama 10 menit. Supernatan yang dihasilkan dibuang dan pellet yang tersisa disimpan pada suhu -80°C untuk diuji profil protein

b. Konfirmasi kebenaran ekspresi

b.1 SDS PAGE

Kebenaran ada tidaknya ekspresi protein fusi Gst-NS1 dilakukan dengan analisis SDS-PAGE 8%. Sebelum dilakukan analisis, masing-masing pellet ditambahkan dengan larutan TrisEDTA yang mengandung 100 ng/mL lisozim kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 5 menit. Campuran kemudian ditambahkan dengan larutan 2x *loading dye* yang mengandung 200 mM DTT kemudian dipanaskan pada suhu 100°C selama 5 menit. Setelah inkubasi, campuran segera diinkubasi di dalam es selama 5 menit untuk kemudian dianalisis dengan SDS-PAGE 8% dengan tegangan sebesar 100 volt selama 1 jam 30 menit. Hasil elektroforesis diwarnai dengan larutan pewarna biru Coomasie (90 ml H_2O : metanol [1 : 1], 10 ml asam asetat glasial dan 0,25 gr Brilliant Blue G) dengan penggoyangan pelan selama 10 menit. Warna yang berlebihan kemudian dihilangkan dengan larutan penghilang warna biru Coomasie (5% metanol, 7% asam asetat glasial dan 88% H_2O) juga dengan penggoyangan pelan selama satu hari, setelah itu jel poliakrilamid dikeringkan untuk dokumentasi.

b.2 Western blot

Konfirmasi kebenaran ekspresi juga dilakukan dengan uji *western blot* menggunakan antibodi monoclonal anti-Gst berlabel peroksidase (Nacalai Tesque, Japan 2008). Konfirmasi dilakukan dengan mentransfer protein hasil elektroforesis diatas, tanpa pewarnaan, ke membran *Hybond-C* dengan metode *semi dry transfer*.²² Proses transfer dilakukan dengan membuat susunan: kertas *Whatman* - membran *Hybond C* - gel - kertas *Whatman*

dari arah kutub negatif ke kutub positif alat *Semi Dry Transfer* (BioRad). Proses transfer berjalan dengan dapar transfer (2,5 gr Glisin, 5,8 gram Tris Base, 200 mL methanol dan H₂O hingga volume akhir 1 L, pH 8,3), pada tegangan 15 volt selama 1 jam.

Setelah proses transfer selesai, membran kemudian diwarnai dengan larutan *Ponceau S* (2 gr Ponceau S, 30 gr asam trikloroasetat, 30 gr asam sulfosalisilat dan H₂O hingga volume akhir 100 mL) dengan merendam membran selama 5 menit. Setelah pita protein terlihat, membran dipotong-potong sesuai ukuran lajur masing-masing galur bakteri dan dicuci dengan dapar pencuci (500 mL 1x PBS dan 100 µL Tween 0,1%) hingga warna *Ponceau S* hilang. Membran kemudian diinkubasi dengan larutan *blocking* (5% susu skim dalam 1x PBS) selama 18 jam pada suhu 4 °C.

Setelah proses *blocking* selesai, membran melalui tahap pencucian menggunakan dapar pencuci dilanjutkan dengan menginkubasi membran dengan larutan antibodi monoklonal anti-Gst berlabel peroksidase dengan tingkat pengenceran 1:5.000. Inkubasi berlangsung selama 1 jam pada suhu ruang dengan agitasi rendah. Setelah selesai, membran dicuci kembali dengan dapar pencuci dilanjutkan dengan menambahkan larutan substrat (3 mg Diaminobenzidine dalam 5 mL 1x PBS dan 5 µL 30% H₂O₂) dan diinkubasi selama 5 menit. Setelah inkubasi, akan terlihat pita protein target.

3.4.4 Isolasi dan purifikasi protein Gst-NS1

Setelah konfirmasi protein fusi Gst-NS1 benar, dilanjutkan dengan isolasi dan purifikasi protein Gst-NS1. Diawali dengan induksi ekspresi protein dengan kondisi sesuai optimasi (0,1 mM IPTG selama 4 jam induksi). Pelet bakteri dipanen dengan cara pemusingan sesuai metode di atas. Isolasi dan purifikasi protein Gst-NS1 berlangsung dengan tahapan:

a. Lisis sel

Proses lisis sel dilakukan dengan metode beku cair menggunakan *dry ice*-etanol dan air hangat bersuhu 60 °C. Pellet bakteri yang telah diinduksi di resuspensi dengan larutan 1xPBS dan ditambahkan larutan lisozim (10

mg/mL) serta larutan DNase-A (7,2 mg/mL) kemudian diinkubasi selama 5 menit pada suhu 37 °C. Campuran ini kemudian di beku cair selama 30 kali pengulangan. Setelah sel lisis (ditunjukkan dengan perubahan warna campuran menjadi translucent dan lengket) campuran dipemusingan dengan kecepatan 12.000 rpm selama 10 menit. Supernatant yang dihasilkan dipisahkan, sedangkan pellet yang ada diresuspensi kembali dengan 1xPBS. Fraksi supernatant dan pellet ini kemudian disimpan pada suhu -80 °C untuk purifikasi protein Gst-NS1.

b. Separasi protein dengan Sephadex G-100

Fraksi supernatant dan pellet yang diperoleh dipisahkan proteinnya berdasarkan berat molekul menggunakan Sephadex G-100. Sephadex G-100 dilarutkan dengan 1x PBS dan ditempatkan di dalam spuit hingga mencapai volume 5 mL, gel ini kemudian dicuci dengan melewati 1x PBS. Tiap fraksi supernatant dan pellet dilewatkan ke dalam gel yang sudah siap ini dan dilakukan pembilasan tiap fraksi menggunakan 1x PBS. Setiap fraksi bilasan ditampung untuk dikonfirmasi tingkat separasi proteinnya menggunakan SDS-PAGE 8%. Pada fraksi dengan protein Gst-NS1 terbanyak dan memiliki sedikit protein pengotor disimpan untuk kemudian dipurifikasi.

c. Purifikasi protein Gst-NS1

Purifikasi protein Gst-NS1 dilakukan menggunakan *Bulk GST Purification Modules* (GE Healthcare, 2006) dengan modifikasi. Fraksi terpilih dari hasil separasi Sephadex G-100 kemudian ditambahkan dengan 50% *Gluthatione Sepharose 4B* kemudian diinkubasi pada suhu 4 °C selama 18 jam dengan penggoyangan pelan. Setelah inkubasi, campuran dilewatkan kedalam *Bulk GST* dan dilanjutkan dengan pencucian menggunakan 1x PBS. Tahap akhir, protein fusi Gst-NS1 diekstraksi menggunakan dapsin elusi (GE Healthcare, 2006) yang mengandung *gluthatione* melalui inkubasi selama 1 jam pada suhu ruang. Hasil elusi ditampung dan ditambahkan dengan gliserol hingga konsentrasi akhir 10% untuk kemudian disimpan pada suhu -80 °C.

d. Konfirmasi protein Gst-NS1

Protein Gst-NS1 hasil purifikasi dikonfirmasi dengan analisis SDS-PAGE 8% dan uji *western blot* menggunakan antibodi monoklonal anti Gst seperti langkah diatas, serta serum pasien infeksi virus dengue-2 yang dikonfirmasi dengan RT-PCR. Membran dengan Gst-NS1 juga diinkubasi dengan serum pasien terinfeksi virus dengue-2 berdasarkan RT-PCR dengan pengenceran 1:1.000 kemudian ditambahkan antibodi anti-IgM manusia berlabel peroksidase (American Qualey, 2007) dengan pengenceran 1:1.000 sebagai antibodi sekunder.

3.4.5 Dot Enzyme Immuno Assay (DEIA)

Sekitar 20 ng protein Gst-NS1 derekatkan ke membran dengan bantuan pompa vakum. Setelah kering, potong-potong membran sesuai dengan ukuran blot. Membran kemudian diinkubasi dengan larutan *blocking* (5% skim milk dalam 1x PBS pH 7.3) selama 18 jam pada suhu 4 °C. Setelah proses *blocking* selesai, membran melalui tahap pencucian menggunakan dapar pencuci (0.01 % tween-20 dalam 1xPBS) dilanjutkan dengan menginkubasi membran dengan serum pasien terinfeksi virus dengue 2 dengan pengenceran 1:1.000. Inkubasi berlangsung selama 2 jam pada suhu ruang dengan agitasi rendah.

Setelah selesai, membran dicuci kembali dengan dapar pencuci dilanjutkan dengan menginkubasi membran dengan larutan antibodi anti-IgM manusia berlabel peroksidase dengan pengenceran 1:1.000 sebagai antibodi sekunder. Setelah inkubasi selama 1 jam pada suhu ruang, membran kembali dicuci dengan dapar pencuci. Terakhir ditambahkan larutan substrat (3 mg Diaminobenzidine dalam 5 mL 1x PBS dan 5 µL 30% H₂O₂) dan diinkubasi selama 5 menit pada kondisi gelap. Reaksi dihentikan dengan menambahkan air suling dan akan terlihat *dot* atau titik hasil reaksi.

Sebagai kontrol, digunakan serum orang sehat, serum negatif widal, antibodi anti-IgM manusia berlabel peroksidase dan membran yang dilapisi protein Gst-NS1 tanpa penambahan serum. Protein Gst juga direkatkan di membran sebagai kontrol negatif.

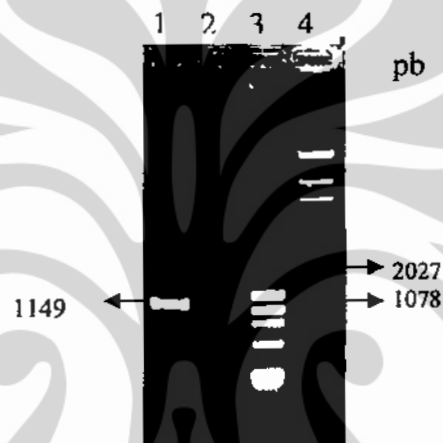
BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Hasil

4.1.1 Amplifikasi gen NS-1

Amplifikasi gen NS1 virus dengue serotype-2 dilakukan dengan teknik *Polymerase Chain Reaction* (PCR) menghasilkan amplicon dengan ukuran sesuai yang diharapkan yaitu pada kisaran 1149 pb.



Gambar 4.1. Elektroforesis PCR produk NS-1 dari cDNA DS3106
Lajur 1. Gen NS-1; 2. Kontrol negatif PCR; 3. phi-X *Hae*III ladder; 4. λ *Hind*III ladder

Dari hasil analisis elektroforesis gel agarosa 0,8% (Gambar 4.1) terlihat adanya hasil amplifikasi pada kisaran 1078pb dan diduga sebagai gen NS1 yang berhasil teramplifikasi. Untuk mengetahui benar tidaknya hasil amplifikasi adalah gen NS1 dilakukan sekuensing untuk mengetahui runutan nukleotida. Hasil sekuensing menunjukkan bahwa hasil amplifikasi adalah benar gen NS1 yang dibandingkan dengan data gen NS1 virus dengue serotipe 2 yang ada di *GenBank* yaitu strain SL767 yang berasal dari Thailand tahun 1991 (Lampiran 1).

Hasil amplifikasi ini kemudian dipurifikasi menggunakan *High Pure PCR Product Purification Kit* (Roche Applied Science). Hasil purifikasi gen NS1 di analisis kembali menggunakan elektroforesis gel agarose 0,8% dan divisualisasikan menggunakan EtBr.

4.1.2 Pengklonaan gen NS1 kedalam pGEX-6P-1

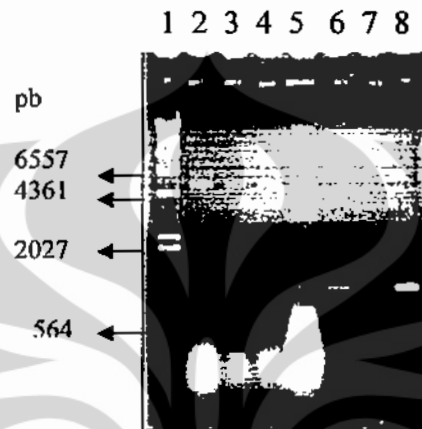
Plasmid pGEX-6P-1 diisolasi dari bakteri *E.coli* galur TOP 10 yang membawa plasmid tersebut. Plasmid diisolasi dari kultur bakteri yang telah mencapai fase *lag* karena pada fase ini bakteri telah mencapai pertumbuhan optimal dan mulai mengalami kematian sehingga dapat diperoleh plasmid dalam jumlah besar. Penambahan larutan P1 (25 mM Tris, 10 mM EDTA dan 100 ng/ml RNase) bertujuan meresuspensi pellet bakteri untuk dapat dilisiskan dengan larutan P2 (200 mM NaOH dan 1% SDS) yang mengandung sabun sebagai agen penghancur dinding sel bakteri. Penambahan larutan P3 (3 M Potasium Asetat) yang berfungsi sebagai agen pengikat DNA sel termasuk plasmid. Pemusingan yang dilakukan bertujuan untuk memisahkan DNA sel yang terbawa di fase supernatant dengan debris sel akibat pelisisan di fase pellet.

Isolasi dilanjutkan dengan penambahan campuran fenol, kloroform dan isoamil alkohol yang bertujuan memisahkan protein-protein sel yang masih terbawa oleh DNA. Pada tahap ini, setelah sentrifugasi kuat plasmid akan berada di fase air yang kemudian dipisahkan dari fenol yang berisi protein dan DNA sel. Fase air ini kemudian di bersihkan dari garam-garam yang kemungkinan masih diikat melalui pengendapan dengan alkohol. Pengeringan plasmid bertujuan untuk menghilangkan sisa-sisa alkohol yang bisa mengganggu kondisi plasmid.

Pengklonaan gen NS1 ke dalam vektor plasmid pGEX-6P-1 dilakukan dengan meligasi gen NS1 dengan plasmid pGEX-6P-1 melalui ujung *overhang* hasil pemotongan dengan enzim *Bam*H1 dan *Sal*1 pada kedua DNA tersebut. Gen insert memiliki situs pemotongan enzim yang ditambahkan pada sekuen primer yang digunakan, sedangkan plasmid memiliki situs pemotongan enzim yang sesuai pada daerah *multiple cloning site*. Pengklonaan diawali dengan memotong insert maupun plasmid menggunakan enzim restriksi yang sesuai. DNA insert yang sudah dipotong dengan kedua enzim akan berukuran ± 1140 pb sedangkan plasmid pGEX-6P-1 yang telah direstriksi akan berukuran ± 4900 pb.

Dari hasil visualisasi (Gambar 4.2) tampak bahwa plasmid yang belum direstriksi (Lajur 5) memiliki lebih dari satu pita, hal ini menunjukkan bahwa plasmid ini memiliki lebih dari satu bentuk yaitu linier maupun *supercoil*. Berbeda dengan plasmid yang telah direstriksi (Lajur 2-5) yang hanya memiliki

satu pita dengan ukuran berkisar diantara 4.361 pb sampai 6.557 pb. Dengan hanya adanya satu pita tersebut, dapat dikatakan bahwa plasmid telah terpotong sempurna dengan hanya memiliki satu bentuk konformasi, berbeda dengan pola migrasi plasmid tanpa pemotongan yang membentuk dua pita DNA.



Gambar 4.2. Elektroforesis hasil pemotongan gen NS-1 dan pGEX-6P-1
Lajur 1. λ HindIII ladder; 2-4. pGEX-6P-1 setelah dipotong; 5. pGEX-6P-1 tanpa pemotongan (*wild type*); 6-7. gen NS1 setelah dipotong; 8. Gen NS1 tanpa pemotongan

Gen NS1 hasil restriksi (Lajur 6,7) tidak terlihat adanya perbedaan pola migrasi DNA karena sekuens DNA yang dihasilkan tetap linier sama halnya dengan sekuens NS1 sebelum dipotong (Lajur 8) dan hasil potongan lain yang berukuran lebih kurang 20 pb kemungkinan telah keluar dari gel selama proses elektroforesis. Gen NS1 dan plasmid pGEX-6P-1 yang telah dipotong kemudian dipurifikasi menggunakan *QIAquick Gel Extraction Kit* untuk menghilangkan sisa-sisa garam dari dapar reaksi dan potongan-potongan DNA kontaminan. Dilanjutkan dengan meligasi gen NS1 sebagai insert dengan plasmid pGEX-6P-1 sebagai vektor. Plasmid rekombinan pGEX-6P-1 yang mengandung gen NS1 selanjutnya disebut pGD₂NS.

Reaksi ligasi kemudian ditransformasikan ke dalam bakteri *E.coli* galur TOP10 yang sudah dikondisikan kompeten menerima plasmid rekombinan. Bakteri ini dikondisikan kompeten menggunakan CaCl₂ dingin yang berfungsi sebagai ion transfer untuk memudahkan bakteri untuk membuka pori membrannya saat diperlakukan kejutan panas sehingga plasmid rekombinan dapat masuk ke dalam sel bakteri. Bakteri pembawa plasmid rekombinan kemudian diseleksi dengan menumbuhkan bakteri transforman ke media LB agar

mengandung ampisillin. Dari 30 ng reaksi ligasi yang ditransformasikan, diperoleh 120 koloni *E.coli* yang diduga sebagai koloni pembawa plasmid rekombinan pGD₂NS.

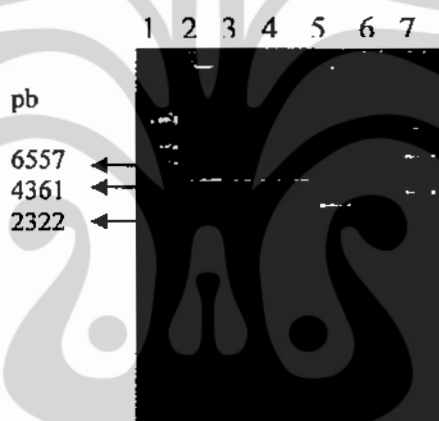
Kebenaran ada tidaknya plasmid rekombinan yang dimiliki koloni dilakukan dengan metode PCR koloni dimana reaksi PCR sama dengan reaksi PCR insert gen NS1 dengan template koloni bakteri hasil transformasi. Selain itu, dilakukan pula reaksi PCR dengan mengganti salah satu primer insert dengan primer plasmid pGEX-6P-1 dengan daerah pengenalan di luar *multiple cloning site* plasmid. Reaksi ini membuktikan ada tidaknya insert gen NS1 yang berhasil tersisip dan kebenaran arah orientasi sisipan. Pengujian 16 koloni yang diambil secara acak dari 120 koloni yang tumbuh menunjukkan beberapa koloni *E.coli* pembawa gen NS1 dengan arah orientasi yang benar.



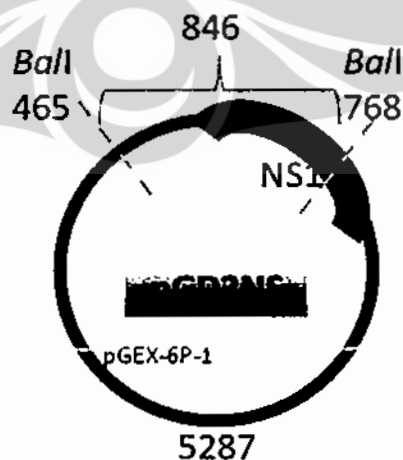
Gambar 4.3. Elektroforesis koloni PCR hasil transformasi
Lajur 1-8. Koloni PCR dengan primer NS-1; K-. control negative PCR;
M. λ HindIII marker; 9-16. Koloni PCR dengan primer NS-1 dan pGEX-6P-1;
M. λ HindIII marker

Dari hasil koloni PCR diketahui bahwa koloni no. 1-6, 9 dan 12 memiliki sisipan gen NS1. Khusus untuk koloni 9 dan 12 diduga kedua koloni ini memiliki insert dengan arah orientasi sisipan yang benar karena diuji dengan pasangan primer insert-plasmid. Kedua koloni ini kemudian diisolasi plasmidnya untuk dikonfirmasi lebih lanjut.

Dari hasil elektroforesis (Gambar 4.5) terlihat adanya pergeseran pola migrasi antara plasmid pGEX-6P-1 *wild type* (Lajur 5) dengan plasmid rekombinan (Lajur 6,7) yang diduga mengandung sisipan gen NS1. Plasmid yang telah diisolasi ini kemudian dikonfirmasi kembali dengan restriksi enzim. Pada tahap ini digunakan enzim *BalI* yang merestriksi plasmid pGEX-6P-1 pada posisi 465 pb dan gen NS1 pada posisi 768 pb. Sehingga apabila arah orientasi sisipan gen NS1 didalam plasmid adalah benar, akan dihasilkan dua pita DNA pada ukuran 5.287pb dan 846 pb (Lajur 3,4) berbeda dengan plasmid pGEX-6P-1 *wild type* tanpa sisipan gen NS1 yang hanya menghasilkan satu pita berukuran \pm 5.000 pb (Lajur 2). Posisi relatif situs pemotongan enzim *BalI* dapat dilihat pada gambar 4.5.



Gambar 4.4. Elektroforesis hasil isolasi dan restriksi pGEX-6P-1 dan pGD₂NS dengan enzim *BalI*. Lajur. 1. λ HindIII marker; 2. pGEX-6P-1 *cut BalI*; 3. pGD₂NS9 *cut BalI*; 4. pGD₂NS9 *cut BalI*; 5. pGEX-6P-1 *wild type*; 6. pGD₂NS9; 7. pGD₂NS12



Gambar 4.5 Posisi relatif situs pemotongan *BalI* pada plasmid rekombinan pGD₂NS

Dari hasil restriksi diketahui bahwa kedua koloni bakteri memiliki sisipan gen NS1 dan dalam arah orientasi yang benar, konfirmasi dilanjutkan melalui sekuensing plasmid. Data sekuensing yang diperoleh juga menunjukkan bahwa plasmid memiliki insert dengan orientasi yang benar (Lampiran 2). Plasmid ini selanjutnya disebut pGD₂NS9 dan pGD₂NS12. Analisis translasi kodon dari plasmid ini juga menunjukkan bahwa nukleotida-nukleotida yang ada menyusun asam-asam amino *in-frame* protein NS1 beserta daerah *multiple cloning site* plasmid maupun situs pemotongan protease serta kodon stop protein (Lampiran 3). Kedua plasmid ini kemudian ditransformasikan kembali ke dalam bakteri *E. coli* galur BL21 kompeten untuk ekspresi protein rekombinan.

4.1.3 Ekspresi protein rekombinan

Ekspresi protein rekombinan Gst-NS1 dilakukan dalam sistem ekspresi bakteri *E. coli* strain BL21 dengan fenotip *amp^r*, *hsdS* (r_B^- , m_B^-), dan *gal*. Dari hasil optimasi diketahui jumlah IPTG yang diperlukan sebesar 0.1 mM dengan masa induksi selama 4 jam.

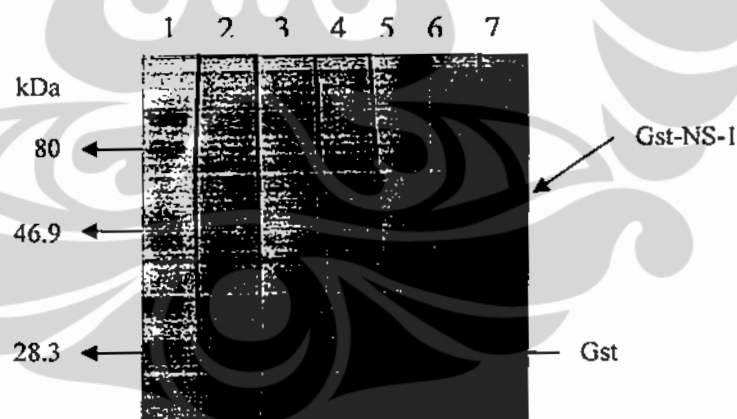


Gambar 4.6. Analisis hasil ekspresi protein rekombinan pada SDS-PAGE 8%
Lajur. 1. Marka protein; 2. *E. coli* BL21 tanpa induksi; 3. *E. coli* BL21 dengan induksi; 4. pGEX-6P-1 tanpa induksi; 5. pGEX-6P-1 dengan induksi; 6. pGD₂NS12 tanpa induksi; 7. pGD₂NS12 dengan induksi; 8. Virus dengue serotype-2

Hasil analisis ekspresi protein dengan elektroforesis SDS-PAGE 8% (Gambar 4.6) menunjukkan tidak adanya perbedaan profil protein masing-masing strain *E. coli* BL21 *wild type*, *E. coli* BL21 pGEX-6P-1 *wild type* dan *E. coli* BL21 pGD₂NS12 tanpa induksi IPTG. Lain halnya dengan kondisi induksi, perbedaan profil protein terlihat pada strain *E. coli* BL21 pGEX-6P-1 *wild type*

dengan *E. coli* BL21 pGD₂NS12. Pada *E. coli* BL21 pGEX-6P-1 *wild type* yang diinduksi terlihat adanya ekspresi berlebih berupa pita tebal pada protein berukuran antara 20.9 kDa dan 32.5 kDa yang diduga adalah protein Gst. Protein Gst merupakan protein terlarut dengan berat molekul 26 kDa. Sementara pada *E. coli* BL21 pGD₂NS12 yang diinduksi, terlihat adanya ekspresi berlebih berupa pita tebal pada protein berukuran antara 80 kDa dan 46.9 kDa yang diduga adalah protein rekombinan Gst-NS1. Protein NS1 memiliki berat molekul antara 42-50 kDa, sehingga protein rekombinan Gst-NS1 memiliki berat molekul relatif sebesar 75 kDa.

Profil protein yang berbeda ini dikonfirmasi kembali melalui uji *western blot* menggunakan antibodi monoklonal anti-Gst berlabel peroksidase dengan tingkat pengenceran 1:5.000. Dari hasil uji *western blot* (Gambar 4.6) terlihat bahwa membran memiliki latar belakang yang bersih yang menunjukkan bahwa proses *blocking* berjalan dengan baik dan tidak terjadi ikatan non spesifik serta proses pencucian membran yang baik. Pita spesifik yang terbentuk menunjukkan adanya reaksi antara peroksidase yang dilabel pada antibodi dengan H₂O₂ yang mengoksidasi substrat.

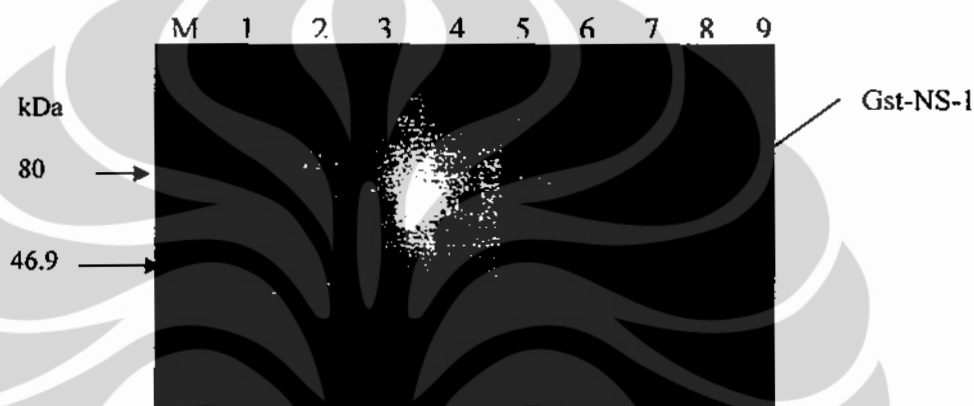


Gambar 4.7. Analisis ekspresi dengan western blot menggunakan mAb-anti Gst
Lajur 1. Marka protein; 2. *E. coli* BL21 tanpa induksi; 3. *E. coli* BL21 dengan induksi; 4. pGEX-6P-1 tanpa induksi; 5. pGEX-6P-1 dengan induksi; 6. pGD₂NS12 tanpa induksi; 7. pGD₂NS12 dengan induksi

Dari hasil uji *western blot* protein masing-masing bakteri menunjukkan bahwa protein tebal pada kisaran 28 kDa adalah benar protein Gst (Lajur 5) dan protein tebal pada kisaran 80 kDa adalah benar protein Gst-NS1 (Lajur 7).

4.1.4. Isolasi dan purifikasi protein rekombinan

Isolasi dan purifikasi diawali dengan pelisisan sel bakteri pembawa plasmid rekombinan terinduksi. Pelisisan bertujuan agar sel bakteri menjadi hancur dan protein target terlepas ke dalam supernatant. Fraksi supernatant dan pellet hasil pelisisan sel ini disepari proteinnya berdasarkan ukuran molekul menggunakan Sephadex G-100. Tiap fraksi hasil pelisisian sel disepari berdasarkan volume dan dilihat profil proteinnya menggunakan SDS-PAGE 8%.

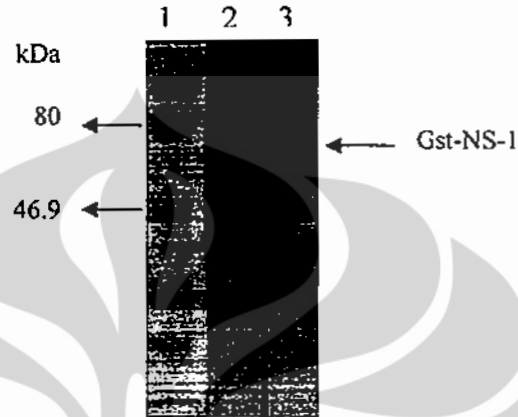


Gambar 4.8. Analisis fraksinasi protein dengan SDS-PAGE 8%
Lajur M1. Marka protein; 1. Fraksi 1; 2. Fraksi 2; 3. Fraksi 3; 4. Fraksi 4; 5. Fraksi 5;
6. Fraksi 6; 7. Fraksi 7; 8. Fraksi. 8; 9. Fraksi. 9

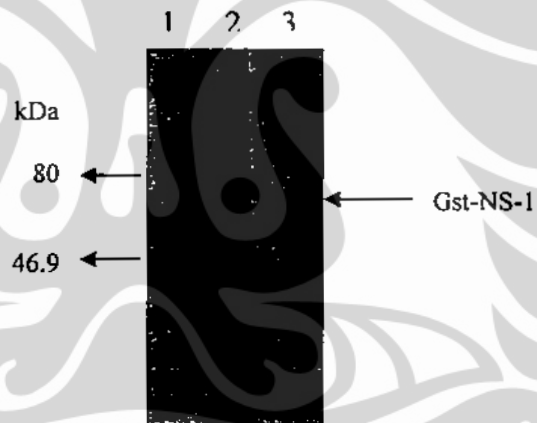
Hasil separasi protein dari fraksi pelet dapat dilihat pada gambar 4.8. Pada fraksi dengan protein Gst-NS1 terbanyak dengan sedikit protein pengotor (fraksi 3-8) kemudian dilakukan purifikasi protein Gst-NS1.

Purifikasi protein Gst-NS1 dilakukan menggunakan *Bulk Gst Purification Kit* yang berdasarkan optimasi dengan memperpanjang masa inkubasi terhadap Gluthatione selama 18 jam untuk mengoptimalkan pengikatan antara protein Gst dengan Gluthatione. Serta saat elusi dilakukan inkubasi selama 1 jam agar protein Gst-NS1 dapat terlepas sempurna dari bed. Dari hasil elusi diperoleh protein Gst-NS1 dengan konsentrasi 21 ng/ μ L dan dikonfirmasi melalui SDS-PAGE 8%. Hasil uji SDS-PAGE 8% hanya menunjukkan pita tipis berukuran \pm 80 kDa yang diduga protein Gst-NS1 sehingga, untuk memperjelas dilanjutkan dengan uji *western blot* menggunakan antibodi monoklonal anti Gst berlabel peroksidase dan serum pasien terkonfirmasi infeksi virus dengue serotype-2 berdasarkan RT-PCR.

Dari hasil uji *western blot* terlihat bahwa protein Gst-NS1 yang diperoleh sudah dalam keadaan cukup murni dengan tingkat kontaminasi yang rendah (Gambar 4.9-4.10). Pita spesifik yang dihasilkan sesuai dengan estimasi ukuran protein Gst-NS1 yaitu pada kisaran 80 kDa hingga 46.9 kDa.



Gambar 4.9. Hasil uji western blot protein Gst-NS-1 dengan antibodi monoklonal anti Gst Lajur 1. Marka protein; 2. Elusi pellet; 3. Elusi supernatant



Gambar 4.10. Hasil uji western blot protein Gst-NS-1 dengan serum pasien Lajur 1. Marka protein; 2. Elusi pellet; 3. Elusi supernatant

4.1.5 Dot Enzyme Immunoassay

Protein Gst-NS1 hasil purifikasi diuji lebih lanjut dengan metode DEIA. Pengujian berjalan dengan merekatkan protein Gst-NS1 hasil purifikasi diatas membran. Dari hasil pengujian DEIA (Gambar 4.11) diketahui bahwa protein Gst-NS1 bereaksi dengan serum pasien infeksi dengue (4.11.d) dan latar belakang membran tidak dipengaruhi oleh antibodi sekunder anti IgM manusia (Gambar 4.11.b) berlabel peroksidase. Selain itu, pada kontrol negatif membran

yang tidak diberikan serum (Gambar 4.11.c) tidak terlihat adanya reaksi yang menunjukkan bahwa proses *blocking* berjalan baik.

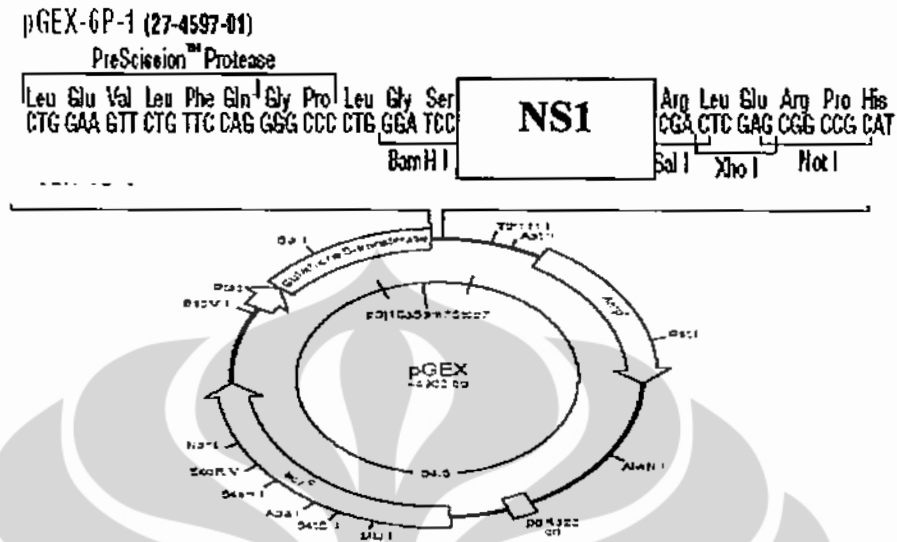


Gambar 4.11. Hasil uji DEIA
a.K- serum negative widal; b. K- anti *human-IgM*,
c. K- tanpa serum; d. Serum pasien

4.2 Pembahasan

Amplifikasi gen NS1 menggunakan primer spesifik terhadap NS1 meliputi daerah 80 pb bagian *upstream* gen NS1. Hal ini dilakukan setelah pada awal amplifikasi digunakan primer yang tidak mengikutkan daerah 80 pb bagian *upstream* gen NS1, yang merupakan bagian C-terminus protein envelope, tidak didapatkan hasil tranformasi. Setelah dilakukan penggantian primer yang mengikutkan daerah tersebut barulah amplifikasi menunjukkan adanya hasil positif. Penambahan 80 pb bagian *upstream* gen NS1 didasari bahwa penambahn bagian ini membantu proses transkripsi dan translasi protein NS1.²³ Selain itu, penambahan 80 pb bagian *upstream* gen NS1 dapat meningkatkan sensitivitas protein rekombinan NS1 yang dihasilkan untuk deteksi infeksi dengue primer (88%) dan untuk deteksi infeksi dengue sekunder (100%) berdasarkan uji ELISA.⁴

Pengklonaan gen NS1 kedalam plasmid pGEX-6P-1 dilakukan dengan menyisipkan gen NS1 diantara situs restriksi *Bam*H1 dan *Sal*1 didaerah *multiple cloning site* plasmid. Posisi relatif gen NS1 yang terinsersi kedalam plasmid dapat dilihat pada gambar 4.12. Plasmid rekombinan ini kemudian disebut pGD2NS.



Gambar 4.12. Konstruksi plasmid rekombinan pGD₂NS

Dari hasil transformasi diperoleh 120 koloni yang menunjukkan bahwa transformasi yang dilakukan memiliki tingkat efisiensi yang baik. Efisiensi transformasi ini ditunjukkan pula pada hasil koloni PCR dimana dari 16 koloni yang diuji 8 diantaranya menunjukkan hasil positif mengandung insert.

Jumlah IPTG dan lamanya waktu induksi dalam tahap ekspresi protein rekombinan terkait dengan jumlah protein rekombinan Gst-NS1 yang diperoleh dan mencegah terjadinya struktur inklusi yang dapat mengganggu proses purifikasi protein rekombinan. Struktur inklusi terjadi karena adanya tingkat ekspresi yang berlebih dari suatu protein tertentu yang menyebabkan protein mengalami kesalahan pelipatan dan membuatnya sulit dipurifikasi.¹⁸ Konfirmasi kebenaran ekspresi dilanjutkan dengan uji *western blot* menggunakan antibodi monoklonal anti Gst yang menunjukkan bahwa pita tebal pada kisaran 26 kDa dan 75 kDa adalah benar protein Gst dan protein Gst-NS1. Dengan hanya adanya satu pita yang dihasilkan juga menunjukkan bahwa antibodi monoklonal anti-Gst yang digunakan tidak bereaksi dengan protein bakteri lainnya selain protein Gst.

Isolasi dan purifikasi protein rekombinan Gst-NS1 diawali dengan pelisisan sel yang dalam penelitian ini menggunakan metode beku cair. Sebelumnya, pelisisan sel dilakukan dengan cara sonikasi ringan (30 output, 30”

pulse on dan $10''$ *pulse off*) menggunakan larutan PBS namun, menggunakan metode ini bakteri tidak banyak yang lisis sehingga protein target masih berada di fase pellet. Hal ini dicurigai terjadi karena terbentuknya struktur inklusi yang disebabkan ekspresi berlebih dari suatu protein tertentu pada bakteri sehingga mengganggu pelisisan sel. Pada penelitian ini kondisi induksi ekspresi dioptimasi dengan hanya menggunakan 0.1 mM induser IPTG selama 4 jam induksi dan dengan suhu ruang.²¹

Optimasi pelisisan sel dengan metode sonikasi juga dilakukan dengan mengganti larutan peresuspensi pellet dari 1xPBS menjadi dapar lisis (10 mM Tris pH 8,0; 0,1% Triton-X ; 0,5 mM PMSF ; 0,1% lisozim dan 5 mM imidazole)²⁴ dan dapar NTT (1,5% N-Lauroysarcosine, 1% Triton X-100, 150 mM NaCl, 10 mM Tris, dengan pH akhir 8,0).²² N-Laurylsarcosine merupakan detergent ringan yang diharapkan mampu menambah tingkat solubilitas protein target agar lebih mudah dipurifikasi sedangkan PMSF (Phenylmethyl-sulfonyl fluoride) berperan sebagai inhibitor protease yang mencegah protein target terdegradasi oleh enzim protease sel. Hasil sonikasi menggunakan kedua dapar lisis ini memberikan hasil lisis yang baik, terlihat dari perubahan warna campuran dari keruh menjadi translucent dan terlihat lengket pada dinding tabung, namun pada saat dilakukan purifikasi menggunakan *Bulk Gst Purification Kit* protein tidak dapat terelusi. Hal ini mungkin dipengaruhi oleh kondisi pelisisan sel maupun derajat keasaman dapar lisis yang terlalu basa sehingga mempengaruhi afinitas protein Gst terhadap dapar elusi, atas dasar ini metode pelisisan sel diubah menggunakan metode beku cair.

Pada metode beku cair hanya menggunakan larutan PBS sebagai dapar lisis dengan pH 7,3. Sebelumnya dengan metode inipun sel bakteri belum dapat terlisis sempurna baru setelah penambahan DNase dan lisozim sebelum proses lisis dilakukan sel dapat terlisis dengan baik. Dengan metode ini, protein target masih lebih banyak ditemukan pada fase pellet namun masih dapat dipurifikasi menggunakan *Bulk Gst Purification Kit*. Fraksi supernatant dan pellet hasil pelisisan sel ini diseparasi proteinnya berdasarkan ukuran molekul menggunakan Sephadex G-100. Sephadex G-100 ini memiliki pori-pori yang bisa melewatkan protein dengan ukuran 4 sampai 100 kDa yang masih dalam kisaran

ukuran protein Gst-NS1. Sebelumnya, purifikasi protein Gst-NS1 langsung dilakukan berdasarkan afinitas tetapi hasil purifikasi menunjukkan masih adanya protein pengotor. Oleh karena itu sebelum dilakukan purifikasi berdasarkan afinitas dilakukan separasi protein berdasarkan ukuran molekul dimana hasil purifikasinya lebih baik dengan protein pengotor yang lebih sedikit.

Dari hasil ini dapat disimpulkan bahwa protein rekombinan Gst-NS1 dapat diisolasi dan dipurifikasi melalui separasi protein dilanjutkan dengan purifikasi berdasarkan afinitas protein Gst. Namun perlu dilakukan optimasi lebih lanjut dalam purifikasi protein Gst-NS1 untuk meningkatkan konsentrasi protein hasil purifikasi.

Tahap purifikasi protein rekombinan merupakan tahap tersulit pada penelitian ini. Penelitian serupa dalam memproduksi protein rekombinan NS1 juga menemui kesulitan dalam hal purifikasi dimana protein rekombinan dalam jumlah besar berada pada fase pelet usai pelisisan sel. Hal ini disebabkan oleh terbentuknya struktur inklusi yang mengakibatkan protein sulit terlarut dan dipurifikasi. Kendala tersebut diatasi dengan mendenaturasi dan melipat kembali struktur inklusi menggunakan urea berkonsentrasi tinggi.⁴ Saya sarankan dalam proses purifikasi protein rekombinan lebih lanjut tahapan ini dapat diterapkan.

Protein NS1 sendiri memiliki 2 bentuk, yaitu dalam bentuk protein ekstraseluler yang disekresikan keluar sel sebagai antigen terlarut serta dalam bentuk antigen permukaan sel terinfeksi.⁷ Protein NS1 dalam bentuk terlarut ini hanya ditemukan pada sel mamalia sehingga kemungkinan protein rekombinan NS1 yang kami hasilkan tidak disekresikan keluar sel.⁸ Hal ini mungkin disebabkan oleh sistem ekspresi protein rekombinan yang kami gunakan adalah sistem ekspresi prokariota yang berbeda dengan sistem ekspresi sel mamalia (eukariota).

Pada penelitian ini dipilih *Dot Enzyme Immunoassay* karena metode ini merupakan metode yang mudah dilakukan sehingga dapat dijadikan alternatif metode diagnosis infeksi dengue. Namun dalam penelitian ini, hasil pengujian yang diperoleh masih sangat kasar dan bersifat kualitatif karena kriteria positif masih terbatas berdasarkan penglihatan visual dengan ada tidaknya *dot* yang terbentuk. Untuk pengembangan metode lebih lanjut, hasil *dot* yang diperoleh

dapat diukur densitasnya dengan alat densitometer sehingga diperoleh nilai ambang kriteria infeksi positif maupun negatif.

Pengujian DEIA terhadap 20 serum pasien terinfeksi dengue menunjukkan adanya reaksi positif dengan terbentuknya *dot* demikian halnya hasil pengujian terhadap 12 serum orang sehat. Hal ini mungkin disebabkan karena antigen yang digunakan masih merupakan protein fusi antara Gst dengan NS1. Protein Gst sendiri merupakan protein yang berasal dari parasit *Schistosoma japonicum* sehingga masih ada kemungkinan bahwa dalam serum pasien maupun serum orang sehat yang diujikan memiliki antibodi anti Gst yang bisa memberikan hasil positif palsu infeksi dengue. Pengujian dengan hanya memblot protein Gst murni yang direaksikan dengan serum pasien maupun serum orang sehat juga memberikan hasil positif reaksi. Sehingga untuk pengembangan metode ini diperlukan pemotongan antara protein Gst dengan protein NS1 dengan protease, sehingga diperoleh hanya protein NS1 murni yang akan digunakan sebagai antigen diagnosis. Selain itu terjadinya ikatan non spesifik reaksi dapat pula disebabkan karena proses pencucian maupun *blocking* yang kurang baik serta dimungkinkan pula masih terdapat kontaminasi protein yang berasal dari *E.coli* yang juga dapat memberikan hasil positif palsu.

Diagnosis infeksi dengue berdasarkan protein NS1 rekombinan telah banyak dikembangkan dan memberikan hasil diagnosis yang baik. Uji ELISA NS1 yang dilakukan dapat memberikan nilai sensitivitas dan spesifisitas pada kisaran 88% hingga 100% baik pada infeksi primer maupun sekunder.⁴⁻⁷

Dari penelitian yang menggunakan kit komersial ELISA NS1 diketahui bahwa sensitivitas dan spesifisitas deteksi antigen mencapai 100% pada hari pertama sakit yang kemudian menurun hingga 29,8% pada hari ke-7. Antigen NS1 sendiri dapat dideteksi sampai hari ke-14 di dalam serum pasien. Sedangkan dalam deteksi IgM anti-NS1 nilai sensitivitas dan spesifisitas mencapai 90,4% pada hari ke-4 dan 95,6% pada hari ke-6.²⁵

Berdasarkan hasil penelitian ini dan dari berbagai studi yang ada dapat disimpulkan bahwa diagnosis infeksi dengue berdasarkan protein NS1 dapat menjadi alat diagnosis dini infeksi dengue dengan sensitivitas dan spesifisitas yang tinggi.^{3-6,10,24-28}

BAB V

KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian ini dapat disimpulkan:

1. Gen NS1 virus dengue serotype-2 strain Indonesia telah berhasil diklon ke dalam plasmid pGEX-6P-1.
2. Protein rekombinan NS1 telah berhasil diekspresikan dengan kondisi penambahan induser IPTG dengan konsentrasi akhir 0.1 mM dan waktu induksi selama 4 jam pada suhu ruang serta aerasi sebesar 200 rpm.
3. Protein rekombinan Gst-NS1 hasil purifikasi sebesar 21 ng/ μ L melalui separasi protein dengan Sephadex G-100 dan *Bulk Purification Kit*.
4. Jumlah protein Gst-NS1 yang berhasil dipurifikasi masih rendah dikarenakan protein dalam jumlah besar masih berada di fase pellet.
5. Protein NS1 rekombinan hasil purifikasi menunjukkan adanya reaktivitas dengan serum pasien dengue.

5.2 Saran

Beberapa saran yang dapat digunakan untuk penelitian lebih lanjut:

1. Diperlukan penelitian lebih lanjut mengenai kondisi optimal purifikasi protein rekombinan Gst-NS1 agar jumlah protein yang berhasil dipurifikasi dapat meningkat.
2. Dapat digunakan urea berkonsentrasi tinggi untuk memecah struktur inklusi agar jumlah protein yang berhasil dipurifikasi dapat meningkat.
3. Diperlukan pemotongan antara protein rekombinan NS1 dengan protein *carrier* Gst agar diperoleh protein rekombinan NS1 murni dan untuk menghindari adanya reaksi silang terhadap protein Gst.
4. Dimungkinkan untuk dilakukan pengklonaan dan ekspresi gen NS1 ke dalam sistem plasmid selain pGEX-6P-1 yang memiliki protein *carrier* berukuran lebih kecil dibandingkan protein Gst.
5. Diperlukan pengembangan metode *Dot Enzyme Immuno Assay* yang lebih baik agar penentuan positif tidaknya infeksi dapat dilakukan secara kuantitatif.

DAFTAR PUSTAKA

1. Gubler, D. J. 1998. *Dengue and dengue hemorrhagic fever*. *Clin. Microbiol. Rev.* **11** (3): 480-496.
2. Badan Litbang Kesehatan , DepKes RI. 2008. Demam berdarah dengue. Jakarta.
3. Shu, P. Y., J. H. Huang. 2004. Current advance in dengue diagnosis. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* **11** (4): 642-650.
4. Huang, J. L., J. H. Huang, R. H. Shyu, C. W. Teng, Y. L. Lin, M. D. Kuo, C. W. Yao, M. F. Shaio. 2001. High-level expression of recombinant dengue viral NS-1 protein and its potential uses as a diagnostic antigen. *J. Med. Virol.* **65**: 553-560.
5. Shu, P. Y., L. K. Chen, S. F. Chang, Y. Y. Yin, L. Chow, L. J. Chien, C. Chin, H. H. Yang, T. H. Lin, J. H. Huang. 2002. Potential Application of Nonstructural Protein NS1 Serotype-Specific Immunoglobulin G Enzyme-Linked Immunosorbent Assay in the Seroepidemiologic Study of Dengue Virus Infection: Correlation of Results with Those of the Plaque Reduction Neutralization Test. *J. Clin. Microb.* **40**: 1840-1844.
6. Shu, P. Y., L. K. Chen, S. F. Chang, Y. Y. Yueh, L. Chow, L. J. Chien, C. Chin, T. H. Lin, J. H. Huang. 2003. Comparison of capture immunoglobulin M (IgM) and IgG enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and nonstructural protein NS1 serotype-specific IgG ELISA for differentiation of primary and secondary dengue virus infection. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* **10** (4): 622-630.
7. Rice, C. M. 1996. Flaviviridae: The viruses and their replication. *Dalam: Fields B. N., D. M. Knipe, P. M. Howley (eds). Fields virology*. 3rd ed. Lippincott-Raven Publisher, Philadelphia: 931-942.
8. Lindenbach, B. D. & C. M. Rice. 2001. Flaviviridae: the viruses and their replication. *Dalam: . Knipe, D. M , P. M. Howley (eds) 2001. Fundamental virology*. 4rd ed. LIPPINCOTT WILLIAMS & WILKINS. Philadelphia: 589-639.
9. Mims, C., H. M. Dockrell, R. V. Goering, I. Roitt, D. Wakelin, M. Zuckerman. 2004. Medical microbiology. 3rd. Mosby Elsevier Limited, London.
10. Alcon, S. A. Talarmin, M. Debruyne, A. Falconar, V. Deubel, M. Flamand. 2002. Enzyme-linked immunosorbent assay specific to dengue virus type 1 nonstructural protein NS1 reveals circulation of the antigen in

- the blood during the acute phase of disease in patients experiencing primary or secondary infections. *J. Clin. Microbiol.* **40** (2): 376-381.
11. Roehrig, J. T. 1997. Immunochemistry of dengue viruses. *Dalam: Gubler, D. J., G. Kuno (eds.). 1997. Dengue and dengue hemorrhagic fever. CAB INTERNATIONAL, New York: 199-219.*
 12. Rothman, A. L. 2004. Dengue: defining protective versus pathologic immunity. *J. Clin. Invest.* **113** (7): 946-951.
 13. Osatomi, K. & H. Sumiyoshi. 1990. Complete nucleotide sequence of dengue type 3 virus genom RNA. *Virology* **176**: 643-647.
 14. Chang, G. J. 1997. Molecular biology of dengue viruses. *Dalam: Gubler, D. J., G. Kuno (eds.). 1997. Dengue and dengue hemorrhagic fever. CAB INTERNATIONAL, New York: 175-198.*
 15. Lanciotti, R. S., C. H. Calisher, D. J. Gubler, G.J. Chang, A.V.Vorndam. 1992. Rapid detection and typing of dengue viruses from clinical samples by using reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.* **30** (3): 545-551.
 16. WHO (World Health Organization). 1997. Dengue haemorrhagic fever: diagnosis, treatment, prevention and control. 2nd ed. World Health Organization, Geneva. Switzerland.
 17. Cardosa, M. J. P. H. Tio. 1991. Dot Enzyme Immunoassay: an alternative diagnostic aid for dengue fever and dengue haemorrhagic fever. *Bull of WHO.* **69** (6): 741-745.
 18. Cooper, G.M. dan R.E. Hausman. 2004. *The Cell : A Molecular Approach. 3rd Edition. ASM Press. Washington, D.C.*
 19. Ausubel, F.M., R. Brent, R.E. Kingston, D.D. Moore, J.G. Seidman, J.A. Smith dan K.Struhl (Eds). 1990. *Current Protocols in Molecular Biology. Greene Publishing Associates and Wiley --Interscience. New York*
 20. Amersham Pharmacia Biotech. 2000. *The Recombinant Protein Handbook : Protein Amplification and Simple Purification.*
 21. Amersham Pharmacia Biotech. 1997. *GST Gene Fusion System. 3rd Edition. Revision 2.*
 22. Sambrook, J., E.F. Fritsh dan T. Maniatis. 1989. *Molecular Cloning : A Laboratory Manual. 2nd Edition. Cold Spring Harbor Laboratory.*
 23. Tajima, Shigeru (2007) Komunikasi personal.

24. Lemes, E.M.B., M.P. Miagostovicsh, A.M.B. Alves, S.M. Costa, A.M.B. Fillipis, G.R.G. Armoa, M.A.V. Araujo. 2005. Circulating human antibodies against dengue NS1 protein: potential of recombinant D2V-NS1 proteins in diagnostics tests. *Jour of Clin Vir.* 32, 305-312.
25. Ampaiwan, C., Chairayatana, W., Pongtanapisith, V., Tangnararatchakit, K., Lertwongrath, S., Yoksan, S. 2008. The use of dengue nonstructural protein 1 antigen for the early diagnosis during the febrile stage in patients with dengue nfection. *Pediatr Infect Dis J*; 27: 43-48.
26. Xu, H., Di, B., Pan, Y., Qiu, L., Wang, Y., Hao, W., He, L., Yuen, K., Che, X. 2006. Serotype 1-specific monoclonal antibody-based antigen capture immunoassay for detection of circulating nonstructural proten NS1: implications for early diagnosis and serotyping of dengue virus infection. *J. Clin Microb.* Aug, p. 2872-2878.
27. Blacksell, S.D., Mammen, M.P.Jr., Thongpaseuth, S., Gibbons, R.V., Jarman, R.G., Jenjaroen, K., Nisalak, A., Phetsouvanh, R., Newton, P.N., Day, N.P.J. 2008. Evaluation of the Panbio dengue virus nonstructural 1 antigen detection and immunoglobulin M antibody enzyme-linked immunosorbent assays for the diagnosis of acute dengue infection in Laos. *Diag Microb ad Infect Dis*; 60: 43-49
28. Kumarasamy, V., Wahab, A.H.A., Chua, S.K., Hassan, Z., Chem, Y.K., Mohamad, M., Chua, K.B. 2007. Evaluation of a commercial dengue NS1 antigen-capture ELISA for laboratory diagnosis of acut dengue virus infection. *J of Vir Met*; 140: 75-79.

Lampiran 1. Runutan nukleotida gen NS-1 plus 80 bp upstream region virus dengue-2 cetakan DS3106 dibandingkan dengan gen NS-1 DV2 strain SL767 Sri Lanka (1991)

1st Nucleotide Sequence

File Name : den2 plus upstream region.nuc
Sequence Size : 1149

2nd Nucleotide Sequence

File Name : sekuens NS1-4 (SL767 Sri Lanka).nuc
Sequence Size : 1056

Unit Size to Compare = 6
Pick up Location = 1

[94.223% / 1056 bp] INT/OPT.Score : < 3858/ 3858 >

```

61' GTGACACTGT ATTTGGGAGT CATGGTGCAG GCCGATAGTG GTTGC GTTGT GAGTTGGAAA
*****
1" GATAGTG GTTGC GTTGT GAGTTGGAAA
*****
121' AACAAAGAAC TGAAATGTGG TAGTGGGATT TTTATCACAG ACAACGTGCA CACATGGACA
*** *****
28" AACGAAGAAC TGAAATGTGG CAGTGGGATT TTGTCTACTG ACAATGTTCA CACATGGACT
*****
181' GAACAATACA AATTCCAACC AGAATCCCCT TCAAAGCTGG CTTCAGCTAT CCAGAAGGCT
*****
88" GAACAATACA AATTCCAACC AGAATCCCCT TCAAAGCTGG CTTCAGCTAT CCAGAAAGCT
*****
241' CATGAAGAGG GCATTTGTGG AATCCGCTCA GTAACAAGAT TGGAGAATCT GATGTGGAAA
*****
148" CATGAGGAGG GCATTTGTGG AATCCGCTCA GTAACAAGAC TGGAAAATCT GATGTGGAAA
*****
301' CAAATAACAC CAGAACTGAA TCACATTCTA TCAGAAAATG AGGTAAAATT GACTATCATG
*****
208" CAAATAACGC CAGAATTGAA TCGCATTCTA TCAGAAAATG AGGTGAAGTT GACTATCATG
*****
361' ACAGGAGACA TTAAGGAAT CATGCAGGCA GGAAAACGAT CCTGCGGCC TCAACCCACT
*****
268" ACAGGAGACA TTAAGGAAT CATGCAGGCT GGTAAAACGAT CGCTGCGGCC TCAGCCTACT
*****
421' GAGCTGAAGT ACTCTTGAA AGCATGGGGC AAAGCGAAA TGCTCTCCAC AGAGCTTCAT
*****
328" GAGCTGAAGT ACTCATGAA AACGTGGGGC AAAGCGAAA TGCTCTCTAC AGAGCCTCAC
*****
481' AACCACACCT TTCTCATTGA TGGCCCCGAA ACAGCAGAAT GTCCCAACAC AAACAGAGCT
*****
388" AACCAGACCT TTCTTATTGA TGGCCCCGAA ACAGCAGAAT GTCCCAACAC AAACAGAGCT
*****
541' TGGAACTCAT TAGAAGTTGA GGACTATGGC TTTGGAGTAT TCACCACCAA CATATGGCTG
*****
448" TGGAACTCAC TAGAAGTTGA AGACTATGGC TTTGGAGTAT TCTCCTCAA CATATGGCTA
*****
601' AAATGAAAG AAAGGCAGGA TGTATTTTGT GACTCAAAC TCATGTCAGC AGCCATAAAA
111 111111 1111 11111
508" AAATGAAAG AAAGACAGGA TGTATTTTGT GACTCAAAC TCATGTCAGC GGCCATAAAA
*****
661' GACAACAGGG CCGTCCACGC CGATATGGGT TATTGGATAG AAAGCGCACT CAATGACACA
*****
568" GACAACAGAG CCGTCCATGC CGATATGGGT TATTGGATAG AAAGCGCACT AAATGACACA
*****

```


721' TGGAAGATTG AGAAAGCCTC TTTTATTGAA GTTAAAAGCT GCCACTGGCC AAAGTCACAC
 ***** * * ***** ***** * * ***** ***** * * *****
 628" TGGAAGATAG AAAAAGCCTA TTTTATCGAA GTTAAAAGCT GCCACTGGCC AAGATCACAC

 781' ACTCTCTGGA GTAATGGAGT GCTAGAAAGT GAGATGATAA TTCCAAAGAA TTTTGCAGGA
 ***** * * ***** ***** ***** ***** ***** ***** * *
 688" ACTCTCTGGA GCAATGGAGT GCTAGAAAGT GAGATGATAA TTCCAAAGAA TTTTGTGGA

 841' CCAGTGTCAC AACACAATA CAGACCAGGT TATCATAAC AAACGGCAGG ACCCTGGCAT
 ***** ***** ***** ***** ***** ***** ***** *****
 748" CCAGTGTCAC AACACAATA CAGACCAGGC TATCACACAC AAACAGCAGG ACCCTGGCAT

 901' CTAGGTAAGC TTGAGATGGA CTTTGATTTC TGCGAAGGAA CCACAGTGGT AGTGACTGAG
 ** ***** ***** ***** ***** ***** ***** *****
 808" CTTGGTAAGC TTGAGATGGA CTTTGATTTC TGCGAAGGAA CCACAGTGGT GGTGACTGAG

 961' GACTGTGGAA ATAGAGGACC CTCTTTAAGA ACAACTACTG CTTCTGGAAA ACTCATAACA
 ***** ***** ***** * * ***** * * ***** ***** *****
 868" GACTGTGGAA ATAGAGGACC CTCTTTGAGA ACAACTACTG CCTCTGGAAA ACTCATAACA

 1021' GAATGGTGCT GCCGATCTG CACATTACCA CCGCTAAGGT ACAGAGGTGA GGATGGATGC
 ***** ***** ***** ***** * ***** ***** *****
 928" GAATGGTGCT GCCGATCTG CACATTACCA CCGCTAAGAT ACAGAGGTGA GGACGGATGC

 1081' TGGTATGGAA TGGAAATCAG ACCATTGAAA GAGAAAGAAG AGAACTTGGT CAACTCTTGG
 ***** * * * ***** ***** ***** ***** * * ***** * *
 988" TGGTACGGGA TGGAAATCAG ACCATTGAAA GAGAAAGAAG AGAATTGGT CAACTCCTTG

 1141' GTCACAGCC

 1048" GTCACAGCC

Lampiran 2. Runutan nukleotida plasmid pGD2NS12 dibandingkan dengan runutan nukleotida gen NS-1 plus 80 bp upstream region virus dengue-2 cetakan DS3106

1st Nucleotide Sequence

File Name : den2 plus upstream region.nuc
Sequence Size : 1149

2nd Nucleotide Sequence

File Name : PGD2_NS_12.1_3' tentatif FULL
Sequence Size : 1859

Unit Size to Compare = 6
Pick up Location = 1

[97.737% / 1149 bp] INT/OPT.Score : < 4440/ 4440 >

```

1'          TGGAT AGGAATGAAT TCACGCAGCA CCTCACTGTC TGTGTCACTA
*****
421" GGGCCCCTGG GATCCTGGAT AGGAATGAAT TCACGCAGCA CCTCACTGTC TGTGTCACTA

46' GTCTTAGTGG GGGTCGTGAC ACTGTATTTG GGAGTCATGG TGCAGGCCGA TAGTGGTTGC
** ***** * ***** *****
481" GTATTAGTGG GGGTCGTGAC ATTGTATTTG GGAGTTATGG TGCAGGCCGA TAGTGGTTGC

106' GTTGTGAGTT GGAAAAACAA AGAACTGAAA TGTGGTAGTG GGATTTTAT CACAGACAAC
*****
541" GTTGTGAGTT GGAAAAACAA AGAACTGAAA TGTGGCAGTG GGATTTTAT CACAGACAAC

166' GTGCACACAT GGACAGAACA ATACAAATTC CAACCAGAAT CCCCTTCAA GCTGGCTTCA
** *****
601" GTGCACACAT GGACAGAACA ATACAAATTC CAACCAGAAT CCCCTTCAA GCTGGCTTCA

226' GCTATCCAGA AGGCTCATGA AGAGGGCATT TGTGGAATCC GCTCAGTAAC AAGATTGGAG
*****
661" GCTATCCAGA AGGCTCATGA AGAAGGCATT TGTGGAATCC GCTCAGTAAC AAGACTGGAG

286' AATCTGATGT GGAAACAAAT AACACCAGAA CTGAATCACA TTCTATCAGA AAATGAGGTA
*****
721" AATCTGATGT GGAAACAAAT AACACCAGAA CTGAATCACA TTCTATCAGA AAATGAGGTA

346' AAATTGACTA TCATGACAGG AGACATTAAG GGAATCATGC AGGCAGGAAA ACGATCCCTG
** *****
781" AAGTTGACTA TCATGACAGG AGACATTAAG GGAATCATGC AGGCAGGAAA ACGTTCCCTG

406' CGGCCTCAAC CCACTGAGCT GAAGTACTCT TGGAAAACAT GGGGCAAGC GAAAATGCTC
*****
841" CGGCCTCAAC CCACTGAGCT GAAGTACTCT TGGAAAACAT GGGGCAAGC GAAAATGCTC

466' TCCACAGAGC TTCATAACCA CACCTTTCTC ATTGATGGCC CCGAAACAGC AGAATGTCCC
*****
901" TCCACAGAGC TTCATAACCA CACCTTTCTC ATTGATGGCC CCGAAACAGC AGAATGTCCC

526' AACACAAACA GAGCTTGGAA CTCATTAGAA GTTGAGGACT ATGGCTTTGG AGTATTACC
*****
961" AACACAAACA GAGCTTGGAA CTCATTAGAA GTTGAAGACT ATGGCTTTGG AGTATTACC

586' ACCAACATAT GGCTGAAACT GAAAGAAAGG CAGGATGTAT TTTGTGACTC AAAACTCATG
*****
1021" ACCAACATAT GGCTGAAATT GAAAGAAAGG CAGGATGTAT TTTGTGACTC AAAACTCATG

```

646' TCAGCAGCCA TAAAAGACAA CAGGGCCGTC CACGCCGATA TGGGTTATTG GATAGAAAGC

 1081" TCAGCAGCCA TAAAAGACAA CAGAGCCGTC CACGCCGATA TGGGTTATTG GATAGAAAGC

 706' GCACTCAATG ACACATGGAA GATTGAGAAA GCCTCTTTTA TTGAAGTTAA AAGCTGCCAC

 1141" GCACTCAATG ACACATGGAA GATTGAGAAG GCCTCTTTTA TTGAAGTTAA AAGCTGCCAC

 766' TGGCCAAAGT CACACACTCT CTGGAGTAAT GGAGTGCTAG AAAGTGAGAT GATAATTCCA

 1201" TGGCCAAAGT CACACACTCT CTGGAGTAAT GGAGTGCTAG AAAGTGAGAT GATAATTCCA

 826' AAGAATTTTG CAGGACCAGT GTCACAACAC AACTACAGAC CAGGTTATCA TACACAAACG

 1261" AAGAATTTTG CAGGACCAGT GTCACAACAC AATTACAGAC CAGGCTATCA TACACAAACG

 886' GCAGGACCCT GGCATCTAGG TAAGCTTGAG ATGGACTTTG ATTTCTGCGA AGGAACCACA

 1321" GCAGGACCCT GGCATCTAGG CAGGCTTGAG ATGGACTTCG ATTTCTGCGA AGGAACCACA

 946' GTGGTAGTGA CTGAGGACTG TGGAAATAGA GGACCCTCTT TAAGAACAAC TACTGCTTCT

 1381" GTGGTAGTGA CTGAGGACTG TGGAAATAGA GGACCCTCTT TAAGAACAAC TACTGCTTCT

 1006' GGAAAAC TCA TAACAGAATG GTGCTGCCGA TCTTGACAT TACCACCGCT AAGGTACAGA

 1441" GGAAAAC TCA TAACAGAGTG GTGCTGCCGA TCTTGACAT TACCACCGCT AAGGTACAGA

 1066' GGTGAGGATG GATGCTGGTA TGGAAATGGAA ATCAGACCAT TGAAAGAGAA AGAAGAGAAC

 1501" GGTGAGGACG GATGCTGGTA TGGAAATGGAA ATTAGACCAT TGAAAGAGAA AGAAGAGAAC

 1126' TTGGTCAACT CTTTGGTCAC AGCC

 1561" TTGGTCAACT CCTTGGTCAC AGCCTGAGTC GACTCGAGCG GCCGCATCGT GACTGACTGA

Lampiran 3. Runutan asam amino pGD2NS12 dibandingkan dengan runutan asam amino gen NS-1 plus 80 upstream region

Sequence 1 : asam amino pGD2NS12
Size : 619
Matching Position : 1 - 619

Sequence 2 : aa. ns-1 dv2 upstream
Size : 383
Matching Position : 1 - 383

MCS pGEX-6P-

```

121 : QATFGGGDHP PKSDLVLFQ GPEGSWIGMN SRSTSLSVSL VLVGVVTTYL GVMVQADSGC
       |          *      *      *      *      *
1 : -----|-----WIGMN SRSTSLSVSL VLVGVVTTYL GVMVQADSGC
           |
           | protease
181 : VVSWKNKELK CGSGIFITDN VHTWTEQYKF QPESPSKLAS AIQKAHEEGI CGIRSVTRLE
       *      *      *      *      *      *      *      *
36 : VVSWKNKELK CGSGIFITDN VHTWTEQYKF QPESPSKLAS AIQKAHEEGI CGIRSVTRLE

241 : NLMWKQITPE LNHILSENEV KLTIMTGDIK GIMQAGKRSL RPQPTELKYS WKTWGKAKML
       *      *      *      *      *      *      *      *
96 : NLMWKQITPE LNHILSENEV KLTIMTGDIK GIMQAGKRSL RPQPTELKYS WKTWGKAKML

301 : STELHNHTFL IDGPETAACP NTNRAWNSLE VEDYGFVFT TNIWLKLER QDVFCDKLM
       *      *      *      *      *      *      *      *
156 : STELHNHTFL IDGPETAACP NTNRAWNSLE VEDYGFVFT TNIWLKLER QDVFCDKLM

361 : SAAIKDNRV HADMGYWIES ALNDTWKIEK ASFIEVKSCH WPKSHTLWSN GVLESEMIIP
       *      *      *      *      *      *      *      *
216 : SAAIKDNRV HADMGYWIES ALNDTWKIEK ASFIEVKSCH WPKSHTLWSN GVLESEMIIP

421 : KNFAGPVSQH NYRPGYHTQT AGPWHLGRLE MDFDFCEGTT VVVTEDCGNR GPSLRRTTAS
       *      *      *      *      *      *      *      *
276 : KNFAGPVSQH NYRPGYHTQT AGPWHLGKLE MDFDFCEGTT VVVTEDCGNR GPSLRRTTAS
                                           stop
481 : GKLITEWCCR SCTLPPLRYR GEDGCWYGME IRPLKEKEEN LVNSLVTA*V DSSGRIVTD*
       *      *      *      *      *      *      *      *
336 : GKLITEWCCR SCTLPPLRYR GEDGCWYGME IRPLKEKEEN LVNSLVTA-- -----

```



RIWAYAT HIDUP

1. Nama : Fithriyah
2. NPM : 0606 000 106
3. Alamat : Jl. Salemba Tengah XI no. C77, Jakarta Pusat
4. Agama : Islam
5. Tempat/Tanggal lahir : Jakarta, 12 Februari 1984
6. Riwayat Pendidikan :

SD	: SDN Bhakti Handayani 1 Bekasi	Lulus Tahun 1995
SMP	: SMP Muhammadiyah 3 Jakarta	Lulus Tahun 1998
SMA	: SMA Negeri 27 Jakarta	Lulus Tahun 2001
S1	: Universitas Diponegoro	Lulus Tahun 2005
	Jurusan Biologi Fakultas MIPA	
S2	: Universitas Indonesia	Lulus Tahun 2008
	Program Magister Ilmu Biomedik	

PRODUKSI PROTEIN NON STRUKTURAL 1 VIRUS DENGUE SEROTIPE 2 STRAIN INDONESIA SEBAGAI REAGEN DIAGNOSIS INFEKSI DENGUE

Fithriyah^a, T. Mirawati Sudiro^a, Beti Ernawati Dewi^a, Andriansjah Rukmana^a, Cucunawangsih^a
^a Departemen Mikrobiologi, Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia. Jl. Pegangsaan Timur No.16 Jakarta
titi_sjatha@yahoo.com

Infeksi virus dengue masih menjadi masalah kesehatan di Indonesia dengan angka kejadian yang cukup besar setiap tahunnya. Protein non-struktural 1 (NS1) diketahui bersifat imunogenik dan dihasilkan di awal infeksi sehingga sesuai untuk digunakan sebagai antigen diagnostik. Gen NS1 di amplifikasi dari cDNA virus dengue serotype-2 strain DS-3106 pasien DHF Jakarta dengan PCR, kemudian di klon ke pGEX-6P-1 dan diekspresikan di dalam baketri *E. coli* strain BL-21. Protein NS1 berhasil dipurifikasi menggunakan Sephadex-G-100 serta glutathione Sepharose 4B dengan kadar 21 ng/ μ L dan menunjukkan reaktivitas terhadap serum pasien infeksi dengue. Produksi protein NS1 secara rekombinan dapat menjadi alternatif cara untuk menyediakan antigen dalam skala besar dan aman yang dapat digunakan dalam pengembangan diagnosis infeksi dengue.

Kata kunci: protein NS1, ekspresi protein, virus dengue

Pendahuluan

Demam berdarah dengue merupakan salah satu penyakit infeksi serius yang telah mewabah di Indonesia. Uji diagnostik infeksi berdasarkan serologi yang ada seperti HI, IgM atau IgG ELISA memiliki berbagai kekurangan mulai dari diperlukannya serum berpasangan dari 2 fase infeksi, uji yang baru bisa dilakukan pada hari ke-4 sampai kemungkinan terjadinya reaksi silang yang dapat memberikan hasil positif maupun negatif palsu. Uji diagnostik yang lain seperti RT-PCR, PRNT maupun kultur virus dapat memberikan hasil yang lebih baik tapi tidak sesuai untuk dijadikan uji diagnostik rutin.

Virus dengue memiliki 3 protein struktural dan 7 protein non struktural. Protein non struktural 1 (NS1) diketahui bersifat immunogenik, dihasilkan di awal infeksi serta tidak memberikan reaksi silang terhadap virus golongan flavivirus yang lain sehingga dapat dijadikan antigen yang sesuai dalam diagnostik infeksi dengue. Kini telah beredar kit komersial yang didasari deteksi antigen maupun antibodi anti-NS1, namun kit ini tidak menggunakan antigen NS1 yang berasal

dari strain virus asli Indonesia yang dapat mengurangi nilai sensitivitas untuk digunakan di Indonesia. Dari permasalahan diatas, studi ini bertujuan memproduksi protein NS1 secara rekombinan yang dapat digunakan sebagai antigen diagnostik infeksi dengue sehingga mengurangi ketergantungan pada kit komersial.

Metode

Amplifikasi gen NS1

Amplifikasi gen NS1 dilakukan dengan metode PCR menggunakan primer forward d2-229-sBam: 5'- CGC GAG GAT CCT GGA TAG GAA TGA ATTC ACGC- 3' dan primer reverse d2-NS1-350-cSal: 5'- CGC GAG GAT CCT GGA TAG GAA TGA ATTC ACGC- 3'. Kedua primer dirancang menggunakan software Genetyx Win Version untuk memiliki situs restriksi *Bam*HI dan *Sal*I. Hasil amplifikasi dipurifikasi dengan kit purifikasi (Roche Applied Science) kemudian disekuens dan dibandingkan dengan data gen NS1 dari GenBank.

Pengklonaan NS1 dengan pGEX-6P-1

Gen NS1 dan plasmid pGEX-6P-1 direstriksi dengan enzim *Bam*HI dan *Sal*I untuk kemudian diligasi. Hasil ligasi ditransformasikan kedalam *E.coli* galur TOP10. Konfirmasi kebenaran insersi dilakukan dengan koloni PCR menggunakan primer insert dan plasmid, pemotongan plasmid dengan enzim restriksi *Bal*I serta sekuensing plasmid. Plasmid yang memberikan hasil konfirmasi positif ditransformasikan kembali kedalam *E. coli* galur BL21 untuk ekspresi protein.

Ekspresi Protein Gst-NS1

Ekspresi protein rekombinan dilakukan melalui penambahan induser IPTG (*Isopropyl-β-D-galactosidase*) kedalam kultur dengan konsentrasi final 0,1 mM. Induksi berjalan selama 4 jam pada temperatur ruang. Profil protein kemudian dianalisis SDS-PAGE 8%, dilanjutkan dengan pewarnaan.

Konfirmasi ekspresi dilanjutkan dengan uji western blot. Jel hasil elektroforesis ditransfer ke membran secara *semi-dry* berdasarkan Sambrook

et.al, 1989. Membran kemudian di inkubasi di dalam dapar *blocking* (5% susu skim dalam 1xPBS) dan dicuci dengan dapar pencuci (0,05% Tween-20 dalam 1xPBS). Membran kemudian direaksikan dengan antibodi monoclonal anti-Gst berlabel peroksidase (Nacalai Tesque, Japan 2008) dengan tingkat dilusi 1:5000 selama 1 jam. Kemudian ditambahkan larutan substrat (3 mg Diaminobenzidine dan 5 μ L H₂O₂ dalam 5 mL 1xPBS) dan diinkubasi dalam kondisi gelap selama 15 menit.

Isolasi dan Puifikasi Gst-NS1

Pellet bakteri dari kultur terinduksi diresuspensi dengan 1xPBS, kemudian ditambahkan dengan lisozim dan DNase kemudian dilisis melalui metode beku cair dengan *dry-ice* etanol dan air hangat bersuhu 60 °C. Pelisisan sel dilakukan selama 30 siklus. Hasil lisis kemudian disentrifugasi pada 12.000 rpm, 4 °C selama 10 menit. Supernatant yang dihasilkan diambil dan pellet yang tersisa diresuspensi kembali dengan 1x PBS. Supernatant dan pellet kemudian dianalisis SDS-PAGE 8%.

Fase pellet kemudian dipisahkan berdasarkan volume dengan Sephadex-G100. Masing-masing fraksi hasil separasi dianalisis SDS-PAGE 8%. Fraksi terpilih dari hasil separasi protein dilanjutkan dengan purifikasi menggunakan kit purifikasi Gst Bulk Purification (GE Healthcare, 2007).

Protein Gst-NS1 hasil purifikasi dianalisis SDS-PAGE 8% dan dilanjutkan dengan uji *western blot* menggunakan antibodi monoclonal anti-Gst (Nacalai Tesque Japan, 2008) dan serum pasien terinfeksi dengue-2. Pengujian dengan serum pasien dilakukan dengan tingkat dilusi 1:1000 dan menggunakan antibodi sekunder anti *human* IgM berlabel peroksidase (American Qualey, 2007) dengan tingkat dilusi 1:1000

Dot Enzyme Immuno Assay

Sebanyak 20 ng protein Gst-NS1 hasil purifikasi di blot ke membran. Setelah melewati tahap *blocking* dan pencucian, membran direaksikan dengan serum pasien terinfeksi dengue serotype 2 dan antibodi anti *human* IgM berlabel peroksidase. Sebagai kontrol digunakan serum negative widal.

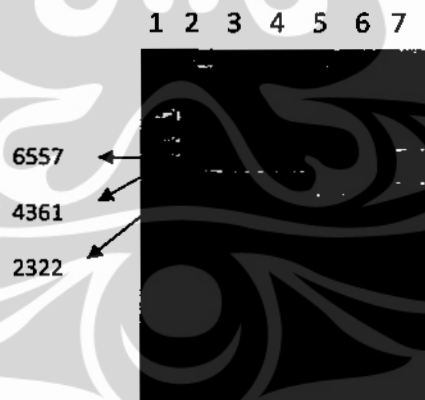
Hasil

Amplifikasi gen NS1

Amplifikasi menghasilkan amplicon pada kisaran 1149 pb. Amplicon disekuensing dan dibandingkan dengan gen NS1 virus dengue serotype 2 strain SL 767 dari Sri Lanka tahun 1991 dan menunjukkan tingkat homologi sebesar 97%.

Pengklonaan gen NS1 dengan pGEX-6P-1

Pengklonaan dilakukan dengan menyisipkan insert gen NS1 diantara situs pemotongan *Bam*HI dan *Sal*I plasmid pGEX-6P-1. Dari 30 ng reaksi ligasi yang ditransformasikan kedalam *E.coli* TOP10, diperoleh 120 koloni. Sebanyak 16 koloni diambil secara acak untuk dikonfirmasi melalui koloni PCR, 8 koloni menggunakan pasangan primer insert NS1 dan 8 koloni lainnya menggunakan primer insert NS1 pada bagian forward dan primer plasmid pGEX-6P-1 pada bagian reverse. Dua koloni (9 dan 12) memiliki sisipan NS1 dengan orientasi yang benar. Plasmid dari kedua koloni ini diisolasi dan dipotong menggunakan enzim *Bal*I. Hasil isolasi dan pemotongan plasmid rekombinan dapat dilihat di gambar 1.



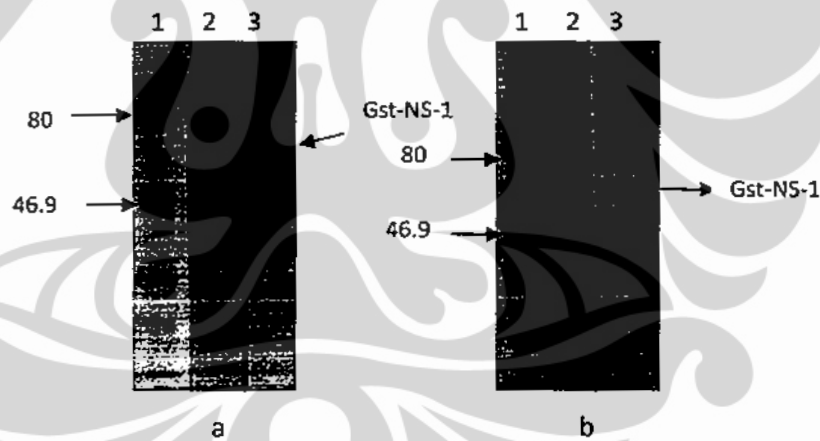
Gambar 1. Elektroforesis hasil isolasi dan restriksi pGEX-6P-1 dan pGD₂NS dengan enzim *Bal*I Lajur. 1. λ HindIII marker; 2. pGEX-6P-1 *cut Bal*I; 3. pGD₂NS9 *cut Bal*I; 4. pGD₂NS9 *cut Bal*I; 5. pGEX-6P-1 *wild type*; 6. pGD₂NS9; 7. pGD₂NS12

Ekspresi protein Gst-NS1

Ekspresi protein dilakukan dengan penambahan induser IPTG (*Isopropyl-B-D-galactosidase*) yang bekerja pada promotor *tac* pada plasmid pGEX-6P-1. Berdasarkan hasil optimasi penambahan IPTG dilakukan dengan konsentrasi final 0,1 mM dengan induksi selama 4 jam pada suhu ruang. Dari analisis SDS-PAGE 8% dan *western blot* menggunakan mAb anti Gst-Peroksidase menunjukkan bahwa protein Gst-NS1 telah berhasil diekspresikan.

Isolasi dan Purifikasi Gst-NS1

Hasil pelisisan sel menunjukkan bahwa protein Gst-NS1 ditemukan dalam jumlah besar di fase pellet. Fraksi-fraksi protein dengan jumlah protein target terbanyak hasil dari separasi dengan Sephadex-G100 dipurifikasi engan *Bulk Gst Purification Kit* menghasilkan protein Gst-NS1 dengan jumlah 21 ng/ μ L. Protein Gst-NS1 hasil purifikasi menunjukkan hasil positif dengan pengujian *western blot* menggunakan mAb anti-Gst berlabel peroksidase dan serum pasien terinfeksi virus dengue serotype 2 berdasarkan RT-PCR.



Gambar 2. Hasil uji western blot protein Gst-NS1, a. dengan mAb anti Gst, b. dengan serum pasien Lajur 1. Marka protein; 2. Elusi pellet; 3. Elusi supernatant

Dot Enzyme Immunassay (DEIA)

Pengujian protein Gst-NSI dengan DEIA menunjukkan hasil positif terhadap serum pasien terinfeksi dengue serotype-2 berdasarkan RT-PCR. Sistem tidak dipengaruhi oleh antibodi sekunder anti IgM manusia berlabel peroksidase.



Gambar 3. Hasil uji DEIA. a. K- serum negative widal; b. K- anti *human-IgM*, c. K- tanpa serum; d. Serum pasien

Pengujian menggunakan 20 serum pasien dan 12 serum orang sehat menunjukkan hasil positif demikian halnya sistem yang menggunakan hanya protein Gst murni sebagai antigen.

Pembahasan

Protein NSI virus dengue diketahui memiliki tingkat imunogenisitas yang tinggi, dihasilkan diawal infeksi, dan tidak memberikan reaksi silang terhadap virus golongan flavivirus yang lain sehingga dapat dijadikan antigen yang sesuai dalam diagnostik infeksi dengue. Amplifikasi gen NSI menggunakan primer yang mencakupi 80 bp daerah upstream NS1 yang membantu proses transkripsi dan translasi protein NSI. Penambahan 80 bp ini juga meningkatkan sensitivitas dan spesifisitas protein NSI rekombinan dengan uji ELISA.

Induksi ekspresi berdasarkan optimasi yang hanya menggunakan 0.1mM IPTG, 4 jam induksi dan pada suhu ruang terkait dalam mencegah terjadinya struktur inklusi yang dapat mengganggu proses purifikasi. Dalam penelitian ini kami menemukan kendala dalam tahap purifikasi dimana protein target lebih banyak ditemukan pada fase pellet yang menunjukkan bahwa protein membentuk struktur inklusi yang menyebabkan protein menjadi tidak larut. Kendala ini akan kami coba atasi menggunakan urea berkonsentrasi tinggi sebagai agen

pendenaturasi. Hasil pengujian DEIA menggunakan 20 serum pasien terinfeksi dengue dan 12 serum orang sehat sebagai kontrol negatif memberikan hasil diagnosis positif dengan terbentuknya *dot*. Hal ini mungkin terjadi karena antigen yang direaksikan masih merupakan protein fusi antara Gst-NS1. Protein Gst sendiri berasal dari parasit *Schistosoma japonicum* yang dikhawatirkan dapat memberi hasil *false positive* diagnosis sehingga untuk pengembangan lebih lanjut diperlukan pemotongan antara protein Gst dengan protein NS1 menggunakan protease untuk memperoleh protein NS1 murni. Terjadinya ikatan non spesifik juga mungkin dipengaruhi oleh pencucian yang kurang baik.

Kriteria positif diagnosis yang masih terbatas pada penglihatan visual juga masih menjadi kendala, diharapkan kriteria ini dapat diperoleh dengan mengukur densitas *dot* yang terbentuk menggunakan alat densitometer dengan nilai ambang rerata densitas yang dihasilkan dari kumpulan serum orang sehat. Berdasarkan hasil penelitian ini dan merujuk pada berbagai penelitian yang ada dapat disimpulkan bahwa diagnosis infeksi dengue berdasarkan protein NS1 dapat menjadi alternatif uji diagnosis infeksi dengue yang baik.

Penelitian ini didanai oleh RISBIN 2007, No. 29/ Iptekdok/ EIJK/ III/ 2007.

Pustaka

1. Gubler, D. J. 1998. *Dengue and dengue hemorrhagic fever*. *Clin. Microbiol. Rev.* 11 (3): 480-496.
2. Badan Litbang Kesehatan , DepKes RI. 2008. Demam berdarah dengue. Jakarta.
3. Shu, P. Y., J. H. Huang. 2004. Current advance in dengue diagnosis. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 11 (4): 642-650.
4. Huang, J. L., J. H. Huang, R. H. Shyu, C. W. Teng, Y. L. Lin, M. D. Kuo, C. W. Yao, M. F. Shaio. 2001. High-level expression of recombinant dengue viral NS-1 protein and its potential uses as a diagnostic antigen. *J. Med. Virol.* 65: 553-560.
5. Shu, P. Y., L. K. Chen, S. F. Chang, Y. Y. Yin, L. Chow, L. J. Chien, C. Chin, H. H. Yang, T. H. Lin, J. H. Huang. 2002. Potential Application of Nonstructural Protein NS1 Serotype-Specific Immunoglobulin G Enzyme-Linked Immunosorbent Assay in the Seroepidemiologic Study of Dengue Virus Infection: Correlation of Results with Those of the Plaque Reduction Neutralization Test. *J. Clin. Microb.* 40: 1840-1844.

6. Shu, P. Y., L. K. Chen, S. F. Chang, Y. Y. Yueh, L. Chow, L. J. Chien, C. Chin, T. H. Lin, J. H. Huang. 2003. Comparison of capture immunoglobulin M (IgM) and IgG enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and nonstructural protein NS1 serotype-specific IgG ELISA for differentiation of primary and secondary dengue virus infection. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 10 (4): 622-630.
7. Lindenbach, B. D. & C. M. Rice. 2001. Flaviviridae: the viruses and their replication. *Dalam: . Knipe, D. M , P. M. Howley (eds) 2001. Fundamental virology.* 4rd ed. LIPPINCOTT WILLIAMS & WILKINS. Philadelphia: 589-639.
8. Alcon, S. A. Talarmin, M. Debruyne, A. Falconar, V. Deubel, M. Flamand. 2002. Enzyme-linked immunosorbent assay specific to dengue virus type 1 nonstructural protein NS1 reveals circulation of the antigen in the blood during the acute phase of disease in patients experiencing primary or secondary infections. *J. Clin. Microbiol.* 40 (2): 376-381.
9. WHO (World Health Organization). 1997. Dengue haemorrhagic fever: diagnosis, treatment, prevention and control. 2nd ed. World Health Organization, Geneva. Switzerland.
10. Cardoso, M. J. P. H. Tio. 1991. Dot Enzyme Immunoassay: an alternative diagnostic aid for dengue fever and dengue haemorrhagic fever. *Bull of WHO.* 69 (6): 741-745.
11. Ausubel, F.M., R. Brent, R.E. Kingston, D.D. Moore, J.G. Seidman, J.A. Smith dan K.Struhl (Eds). 1990. Current Protocols in Molecular Biology. Greene Publishing Associates and Wiley –Interscience. New York
12. Sambrook, J., E.F. Fritsh dan T. Maniatis. 1989. Molecular Cloning : A Laboratory Manual. 2nd Edition. Cold Spring Harbor Laboratory.
13. Tajima, Shigeru (2007) Komunikasi personal.
14. Lemes, E.M.B., M.P. Miagostovicsh, A.M.B. Alves, S.M. Costa, A.M.B. Fillipis, G.R.G. Armoa, M.A.V. Araujo. 2005. Circulating human antibodies against dengue NS1 protein: potential of recombinant D2V-NS1 proteins in diagnostics tests. *Jour of Clin Vir.* 32, 305-312.
15. Ampaiwan, C., Chairayatana, W., Pongtanapisith, V., Tangnararatchakit, K., Lertwongrath, S., Yoksan, S. 2008. The use of dengue nonstructural protein 1 antigen for the early diagnosis during the febrile stage in patients with dengue nfection. *Pediatr Infect Dis J;* 27: 43-48.
16. Xu, H., Di, B., Pan, Y., Qiu, L., Wang, Y., Hao, W., He, L., Yuen, K., Che, X. 2006. Serotype 1-specific monoclonal antibody-based antigen capture immunoassay for detection of circulating nonstructural proten NS1: implications for early diagnosis and serotyping of dengue virus infection. *J. Clin Microb.* Aug, p. 2872-2878.