

**KONSTRUKSI PLASMID PENGEKSPRESI  
mRNA BISISTRONIK UNTUK TRANSLASI SIMULTAN  
PROTEIN *HEMAGGLUTININ (HA)* DAN *NEURAMINIDASE (NA)*  
VIRUS INFLUENZA A H5N1  
MELALUI SISTEM IRES-MLV DAN IRES-HIV**

**TESIS**

**Diajukan sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar  
Magister Ilmu Biomedik (M. Biomedik)**

**ELIZABETH IKA PRAWAHJU ARISSETIANINGSIH  
NPM: 06 06 000 062**



**UNIVERSITAS INDONESIA  
FAKULTAS KEDOKTERAN  
PROGRAM STUDI ILMU BIOMEDIK  
JAKARTA  
MEI 2009**

## HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS

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

**Nama : Elizabeth Ika Prawahju Arisetianingsih**

**NPM : 06 06 000 062**

**Tanda tangan:**



**Tanggal : 29 Mei 2009**

## HALAMAN PENGESAHAN

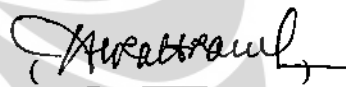
Tesis ini diajukan oleh:

Nama : Elizabeth Ika Prawahju Arisetianingsih  
NPM : 06 06 000 062  
Program Studi : Ilmu biomedik  
Judul Tesis : Konstruksi Plasmid Pengekspresi mRNA Bisistronik  
Untuk Translasi Simultan Protein *Hemagglutinin* (HA)  
Dan *Neuraminidase* (NA) Virus Influenza A H5N1  
Melalui Sistem IRES-MLV Dan IRES-HIV

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

### DEWAN PENGUJI

Pembimbing : dr. Fera Ibrahim, M.Sc., Ph.D, Sp.MK



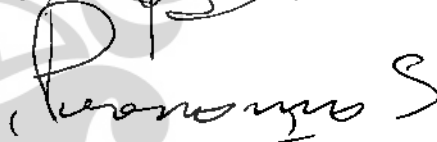
Pembimbing : dr. Budiman Bela, Sp.MK



Penguji : dr. T. Mirawati Soediro, Ph.D



Penguji : Prof. Drs. Purnomo Soeharso, Ph.D



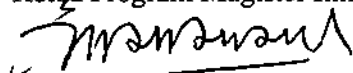
Penguji : dr. Agnes Kurniawan, Ph.D, Sp.ParK



Ditetapkan di : Jakarta

Tanggal : 29 Mei 2009

Ketua Program Magister Ilmu Biomedik



Dr. rer. physiol. dr. Septelia Inawati Wanandi



## KATA PENGANTAR

Puji syukur saya panjatkan kepada Tuhan Yang Maha Kuasa, karena atas segala berkat dan kasih karuniaNya, saya dapat menyelesaikan tesis ini. Penulisan tesis ini dilakukan dalam rangka memenuhi salah satu syarat untuk mencapai gelar Magister Biomedik Program Studi Ilmu Biomedik pada Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia. Saya menyadari bahwa, tanpa bantuan dan bimbingan dari berbagai pihak, dari masa perkuliahan sampai pada penyusunan tesis ini, sangatlah sulit bagi saya untuk menyelesaikan tesis ini. Oleh karena itu, saya mengucapkan terima kasih kepada:

1. dr. Fera Ibrahim, M.Sc., Ph.D, Sp.MK, selaku Pembimbing I dan dr. Budiman Bela, Sp.MK selaku Pembimbing II yang telah menyediakan waktu, tenaga, pikiran dan nasehat untuk mengarahkan saya selama masa studi dan dalam penyiapan penelitian sampai penyusunan tesis ini;
2. Dr. rer.physiol. dr. Septelia Inawati Wanandi selaku Ketua Program Studi Ilmu Biomedik, atas kesempatan yang diberikan kepada saya untuk mengikuti pendidikan Program Studi Ilmu Biomedik dan memberi kesempatan kepada saya untuk menyelesaikan pendidikan tepat waktu;
3. dr. Anis Karuniawati, Ph.D., Sp.MK selaku ketua Departemen Mikrobiologi FKUI dan dr. Mardiatuti, M.Sc., Sp.MK selaku Sekretaris Departemen Mikrobiologi, atas kesempatan yang diberikan kepada saya untuk melaksanakan pendidikan di lingkungan Departemen Mikrobiologi FKUI;
4. Pembina, Ketua Pengurus beserta anggota, staf karyawan Laboratorium *Institute of Human Virology and Cancer Biology of the University of Indonesia* (IHVCB-UI) dan terutama dr. Fera Ibrahim, M.Sc., Ph.D, Sp.MK selaku *Director of Science* IHVCB-UI, atas kesempatan yang diberikan kepada saya untuk melaksanakan penelitian di Laboratorium IHVCB-UI;
5. dr. Husniah Rubiana Thamrin Akib, MS., Mkes., Sp.FK selaku Kepala Badan Pengawas Obat dan Makanan (Badan POM) RI dan Dra. Isna Assaratun, Apt., M.Sc. yang telah memberi bantuan dukungan dana dan kesempatan untuk mengikuti pendidikan Program Studi Ilmu Biomedik pada Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia;

6. Drs. Siam Subagyo, M.Si. selaku Kepala Pusat Pengujian Obat dan Makanan Nasional (PPOMN) Badan POM dan Dra. Kusmiaty, M.Pharm. selaku Kepala Bidang Produk Biologi PPOMN yang telah memberikan kesempatan kepada saya untuk menempuh pendidikan Program Studi Ilmu Biomedik pada Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia;
7. Orang tua (Ayahanda Bambang Soegianto dan Ibunda Moerniningsih) yang telah memberi dukungan doa, kasih sayang dan semangat kepada saya selama ini; adik-adik (Putra dan Yaka; Sonny dan Lana; Joseph dan Fieranita; Diki dan Hilliana), serta keponakan-keponakan (Niken, David, Jeshia dan Keyla) untuk kasih sayang dan doa kepada saya selama ini;
8. Sahabat-sahabat saya, Yuni, Fithri, Vivi dan Lulut teman satu angkatan pada Kekhususan Mikrobiologi yang telah memberikan dukungan doa, semangat dan persahabatan; Mbak Silvi selaku Penyelia Lapangan yang telah membagikan ilmu, waktu dan tenaga untuk membimbing saya selama penelitian; Mbak Sofi, Mas Eki, Mbak Aroem, Y. Budi, Pak Tarman, Mbak Wendra, Anjar, Atep, Via, Angela, Sance, Wuri, Adit, Toro, Pak Andi Yasmon, Rayhana, Ibu Yus, Deka, Mbak Henny, Mbak Wani, Mbak Ade, dan Heru; rekan kerja khususnya di Laboratorium Vaksin: Cicik, Endah, Tanti, Asih, Ambar, Rina, Wawan, Anti, Ratih, Mbak Maryati, Zulfa, Anis; Mbak Lin, Kak Risma, Monides, Eniek, dan Dewi yang telah memberikan dukungan doa, kerjasama dan persahabatan selama ini serta sahabat lainnya yang tidak dapat disebutkan satu persatu, terima kasih atas segala kerjasama, bantuan, nasehat, doa dan persahabatan selama penelitian dan penyusunan tesis ini.

Akhir kata, saya berharap Tuhan Yang Maha Kasih berkenan membalas segala kebaikan semua pihak yang telah membantu. Semoga tesis ini membawa manfaat bagi pengembangan ilmu.

Jakarta, 29 Mei 2009

Penulis

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

---

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

Nama : Elizabeth Ika Prawahju Arisetianingsih  
NPM : 06 06 000 062  
Program Studi : Ilmu Biomedik  
Departemen : Mikrobiologi  
Fakultas : Kedokteran  
Jenis Karya : Tesis

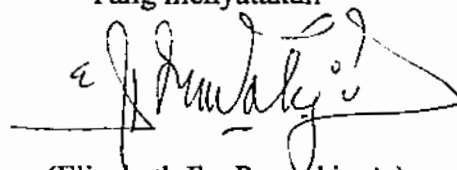
demikian pengembangan ilmu pengetahuan, menyetujui untuk memberikan kepada Universitas Indonesia Hak Bebas Royalti Noneksklusif (*Non-exclusive Royalty-Free Right*) atas karya ilmiah saya yang berjudul:

**Konstruksi Plasmid Pengekspresi mRNA Bisistronik Untuk Translasi Simultan Protein *Hemagglutinin* (HA) Dan *Neuraminidase* (NA) Virus Influenza A H5N1 Melalui Sistem IRES-MLV Dan IRES-HIV**

Beserta 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 selama tetap mencantumkan nama saya sebagai penulis. Adapun hak cipta karya ilmiah ini dimiliki oleh *Institute of Human Virology and Cancer Biology of The University of Indonesia* (IHVCB-UI).

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya.

Dibuat di: Jakarta  
Pada tanggal: 29 Mei 2009  
Yang menyatakan



(Elizabeth Ika Prawahju A.)

## ABSTRAK

Nama : Elizabeth Ika Prawahju Arisetianingsih  
Program Studi : Ilmu Biomedik  
Judul : Konstruksi Plasmid Pengekspresi mRNA Bisistronik Untuk Translasi Simultan Protein *Hemagglutinin* (HA) Dan *Neuraminidase* (NA) Virus Influenza A H5N1 Melalui Sistem IRES-MLV Dan IRES-HIV

Ekspresi *Virus Like Particles* (VLP) mengandung *haemagglutinin* (HA) dan *neuraminidase* (NA) Influenza A mungkin memerlukan ekspresi gen yang mengkode protein secara simultan supaya memperoleh komposisi molekul HA dan NA dalam VLP untuk induksi optimal respon imun protektif karena peningkatan molekul NA dalam penyiapan vaksin VLP. Kondisi tersebut dapat dengan mudah dicapai melalui penempatan gen dalam vektor DNA yang sama. Rancangan DNA untuk ekspresi protein HA dan NA Influenza H5N1, kemudian dibuat menggunakan vektor pra konstruksi sebagai DNA *backbone* awal, yaitu plasmid pcDNA3.1/His A yang mengandung gen sisipan NA H5N1. Sekuen *internal ribosomal entry site* (IRES) Murine Leukemia Virus (MLV) dan Human Immunodeficiency Virus (HIV), gen HA Influenza A H5N1, dan gen bsf-IRES HIV dimasukkan ke dalam DNA *backbone*, sehingga menghasilkan DNA yang mengandung IRES MLV pada hulu gen NA dan IRES HIV pada hulu gen HA, sedangkan gen bsf terletak di antara gen NA dan IRES HIV. Sekuen IRES dimasukkan untuk ekspresi gen HA dan NA secara simultan selama fase G2 / mitosis dalam siklus sel, sedangkan gen bsf dimasukkan untuk mencegah proses reinisiasi setelah terminasi translasi. Orientasi dan akurasi sekuen nukleotida fragmen DNA sisipan dianalisis menggunakan *polymerase chain reaction* (PCR) dan *sequencing* nukleotida. Klon yang membawa fragmen DNA sisipan dengan sekuen nukleotida dalam orientasi benar telah dikonfirmasi melalui *sequencing* nukleotida untuk mendukung kebenaran ekspresi protein HA dan NA yang diperoleh.

Kata kunci:  
HA , NA , H5N1, IRES HIV, IRES MLV

## ABSTRACT

Name : Elizabeth Ika Prawahju Arisetianingsih  
Study Program: Biomedical Science  
Title : Construction of Bicistronic mRNA Expression Plasmid for Simultaneous Translation of H5N1 Influenza A virus Hemagglutinin (HA) and Neuraminidase (NA) proteins through MLV-IRES and HIV-IRES System

Expression of Virus Like Particles (VLP) containing the Influenza A haemagglutinin (HA) and neuraminidase (NA) may require simultaneous expression of the genes that encodes the proteins in order to obtain a balanced composition of HA and NA molecules in the VLP for optimal induction of protective immune response due to the increase of NA molecules in the VLP vaccine preparation. Such a condition can be more easily achieved by placement of the genes in the same vector DNA. A DNA construct for simultaneous expression of H5N1 Influenza A HA and NA proteins was thus constructed utilizing a pre constructed vector as the initial backbone DNA, which was a pcDNA3.1/His A plasmid that contained an insertion of the H5N1 NA gene. The sequences of internal ribosomal entry site (IRES) belonging to Murine Leukemia Virus (MLV) and Human Immunodeficiency Virus (HIV), the HA gene of H5N1 influenza A, and the bsf gene of HIV IRES were introduced into the backbone DNA, such that the resulting DNA contains the MLV IRES upstream to the NA gene and the HIV IRES upstream to the HA gene, while the bsf gene was placed in between the NA gen and the HIV IRES. The IRES sequences were introduced for simultaneous expression of the HA and NA genes during the G2/ Mitosis phase of the cell cycle, while the bsf gene was introduced to prevent reinitiation process after termination of translation. The orientation and the accuracy of the nucleotide sequences of the inserted DNA fragments were analyzed using PCR and nucleotide sequencing. A clone that bears the inserted DNA fragments in the correct orientations with nucleotide sequences that have been confirmed by nucleotide sequencing to support proper expression of the HA and NA proteins, was obtained.

Key words:  
HA, NA, H5N1, HIV IRES, MLV IRES



## DAFTAR ISI

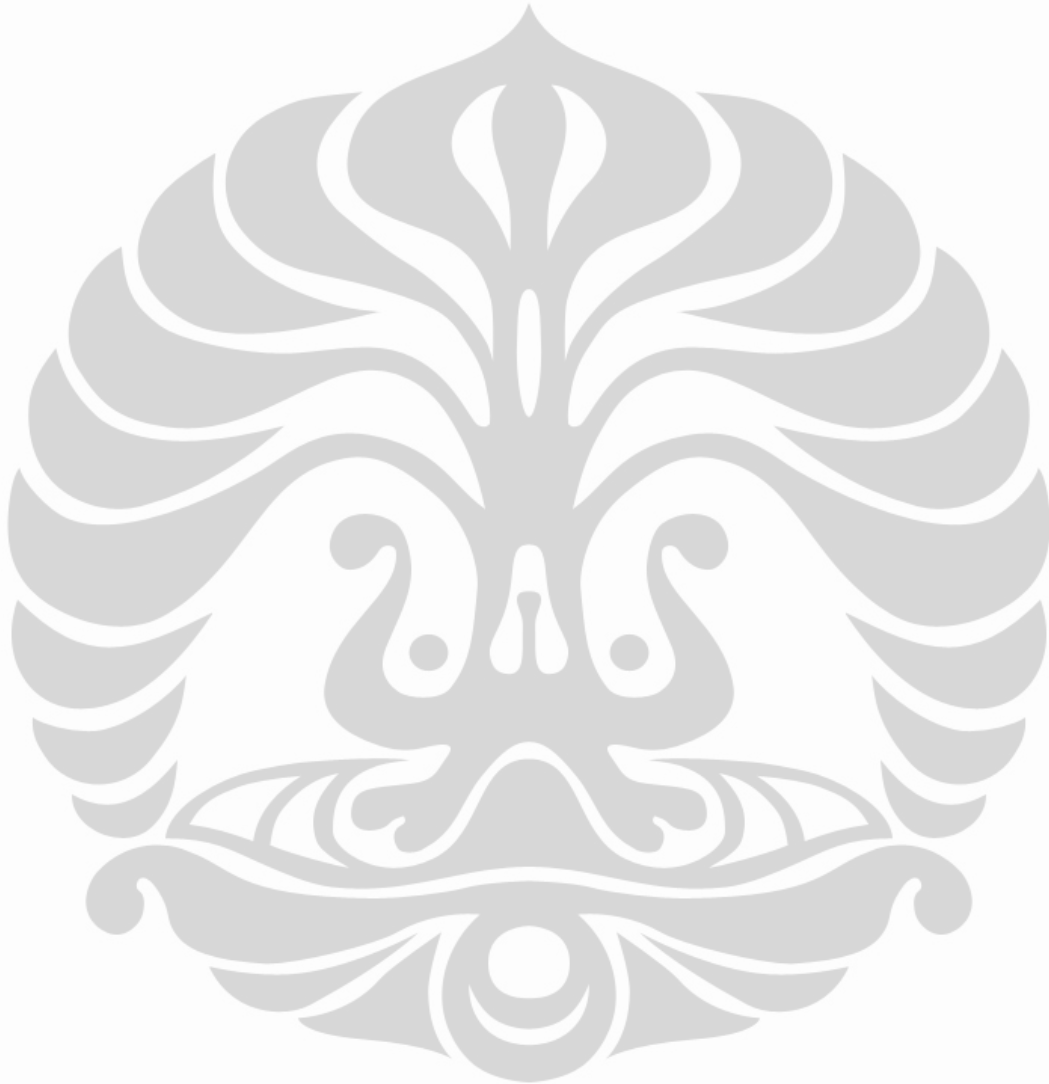
<b>HALAMAN JUDUL</b> .....	i
<b>HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS</b> .....	ii
<b>LEMBAR PENGESAHAN</b> .....	iii
<b>KATA PENGANTAR</b> .....	iv
<b>LEMBAR PERSETUJUAN PUBLIKASI KARYA ILMIAH</b> .....	vi
<b>ABSTRAK</b> .....	vii
<b>DAFTAR ISI</b> .....	ix
<b>DAFTAR TABEL</b> .....	xii
<b>DAFTAR GAMBAR</b> .....	xiii
<b>DAFTAR SINGKATAN</b> .....	xv
<b>DAFTAR SINGKATAN NUKLEOTIDA</b> .....	xvi
<b>DAFTAR SINGKATAN ASAM AMINO</b> .....	xvii
<b>DAFTAR LAMBANG</b> .....	xviii
<b>DAFTAR LAMPIRAN</b> .....	xix
<b>1. PENDAHULUAN</b> .....	1
1.1 Latar Belakang .....	1
1.2 Tujuan Penelitian .....	4
1.3 Manfaat Penelitian .....	5
<b>2. TINJAUAN PUSTAKA</b> .....	6
2.1 Virus Influenza .....	6
2.1.1 Struktur dan genom virus Influenza A .....	6
2.1.2 Siklus hidup virus Influenza A H5N1 .....	9
2.1.3 Patogenesis Influenza A H5N1 .....	11
2.1.4 Respon imun sel hospes terhadap infeksi virus Influenza A H5N1 .....	11
2.1.5 Transmisi virus Influenza A H5N1 .....	12
2.1.6 Epidemiologi .....	13
2.1.7 Pengembangan Vaksin Influenza A H5N1 .....	14
2.1.7.1 Metode propagasi pada telur berembrio .....	14
2.1.7.2 Metode propagasi pada kultur sel .....	15
2.2 Sistem Ekspresi Mamalia .....	17
2.2.1 <i>Internal Ribosome Entry Site (IRES)</i> .....	18
2.2.1.1 IRES <i>Human Immunodeficiency virus</i> .....	19
2.2.1.2 IRES Murine Leukemia virus .....	20
2.2.2 Pengklonaan .....	21
2.2.2.1 Plasmid pBluescript KS (-) .....	21
2.2.2.2 Plasmid pcDNA3.1/His A .....	22
<b>3. BAHAN DAN CARA KERJA</b> .....	24
3.1 Lokasi dan waktu penelitian .....	24
3.2 Bahan .....	24
3.2.1 Fragmen DNA <i>hemagglutinin (HA)</i> dan <i>neuraminidase (NA)</i> virus Influenza A (H5N1) .....	24
3.2.2 Plasmid rekombinan pKS-IRESHIV dan pKS-IRESMLV ...	24

3.2.3 Primer .....	25
3.2.4 Vektor .....	25
3.2.5 Galur bakteri .....	25
3.3 Cara kerja .....	25
3.3.1 Pengsubklonaaan BSF ke dalam plasmid rekombinan pKS IRESHIV#2 pada situs restriksi EcoRV .....	27
3.3.1.1 Pemotongan plasmid rekombinan pKS-IRESHIV#2 .....	27
3.3.1.2 Purifikasi hasil pemotongan .....	28
3.3.1.3 Ligasi DNA sisipan ke dalam vektor .....	29
3.3.1.4 Transformasi hasil ligasi .....	29
3.3.1.5 Isolasi plasmid rekombinan pKS-IRESHIV-bsf .....	30
3.3.1.6 Identifikasi klon pKS-IRESHIV-bsf .....	31
3.3.2 Pengsubklonaaan IRES MLV ke dalam plasmid rekombinan pcDNA3.1/HisA-NA pada situs restriksi HindIII .....	33
3.3.2.1 Persiapan fragmen DNA sisipan IRES MLV .....	33
3.3.2.2 Persiapan vektor <i>backbone</i> pcDNA3.1/His A-NA .....	33
3.3.2.3 Ligasi DNA sisipan ke dalam vektor .....	34
3.3.2.4 Transformasi hasil ligasi .....	34
3.3.2.5 Isolasi plasmid rekombinan pcDNA3.1/His A- IRES MLV-NA .....	34
3.3.2.6 Identifikasi klon pcDNA3.1/His A-IRES MLV-NA .....	35
3.3.3 Pengsubklonaaan fragmen IRES HIV-bsf#1 ke dalam plasmid rekombinan pcDNA3.1/HisA-IRESMLV-NA#1 pada situs restriksi NotI dan EcoRV .....	36
3.3.3.1 Persiapan fragmen DNA sisipan IRES HIV-bsf .....	36
3.3.3.2 Persiapan vektor pcDNA3.1/His A-NA-MLV#1 .....	37
3.3.3.3 Ligasi hasil sisipan ke dalam vektor .....	37
3.3.3.4 Transformasi hasil ligasi .....	37
3.3.3.5 Isolasi plasmid rekombinan pcDNA3.1/His A-IRES MLV- NA-IRES HIV-bsf .....	37
3.3.3.6 Identifikasi klon pcDNA3.1/His A-IRES MLV- NA-IRES HIV-bsf .....	38
3.3.4 Pengsubklonaaan fragmen HA ke dalam plasmid rekombinan pcDNA3.1/HisA-IRESMLV-NA-IRESHIV-bsf#17 pada situs restriksi XbaI ( <i>blunt</i> ) dan ApaI .....	39
3.3.4.1 Persiapan fragmen HA .....	39
3.3.4.2 pcDNA3.1/HisA-IRESMLV-NA-IRESHIV-bsf#17 .....	40
3.3.4.3 Ligasi DNA sisipan ke dalam vektor .....	41
3.3.4.4 Transformasi hasil ligasi .....	41
3.3.4.5 Isolasi plasmid rekombinan pcDNA3.1/His A-IRES MLV-NA-IRES HIV-bsf-HA .....	41
3.3.4.6 Identifikasi klon pcDNA3.1/His A-IRES MLV-NA- IRES HIV-bsf-HA .....	42
<b>4. HASIL DAN PEMBAHASAN .....</b>	<b>44</b>
4.1 Hasil .....	44
4.1.1 Pengsubklonaaan BSF ke dalam plasmid rekombinan pKS IRESHIV# 2 pada situs restriksi EcoRV .....	44

4.1.1.1 Pemastian arah orientasi pKS-IRESHIV# 2 .....	44
4.1.1.2 Pemotongan plasmid rekombinan .....	45
4.1.1.3 Identifikasi klon a pKS-IRESHIV-bsf .....	46
4.1.2 Pengsubklonaan IRES MLV#4 ke dalam pcDNA3.1/HisA-NA pada situs HindIII .....	49
4.1.2.1 Pemotongan plasmid rekombinan .....	49
4.1.2.2 Transformasi hasil ligasi .....	50
4.1.2.3 Identifikasi klon a pcDNA3.1/HisA-IRESMLV-NA .....	52
4.1.3 Pengsubklonaan IRESHIV-bsf# 1 ke dalam pcDNA3.1/HisA- NA-MLV# 1 pada situs NotI – EcoRV .....	59
4.1.3.1 Pemotongan plasmid rekombinan .....	59
4.1.3.2 Transformasi hasil ligasi .....	60
4.1.3.3 Identifikasi klon a pcDNA3.1/HisA-IRESMLV-NA- IRESHIV-bsf .....	62
4.1.4 Pengsubklonaan fragmen HA ke dalam pcDNA3.1/HisA- IRESMLV-NA-IRESHIV-bsf pada situs XbaI-ApaI .....	66
4.1.4.1.Pemotongan plasmid rekombinan .....	66
4.1.4.2 Transformasi hasil ligasi .....	67
4.1.4.3 Identifikasi klon a pcDNA3.1/HisA-IRESMLV-NA- IRESHIV-bsf-HA .....	68
4.2. Pembahasan .....	72
<b>5. KESIMPULAN DAN SARAN .....</b>	<b>83</b>
<b>DAFTAR REFERENSI .....</b>	<b>85</b>
<b>RIWAYAT HIDUP .....</b>	<b>89</b>
<b>LAMPIRAN .....</b>	<b>90</b>
<b>ARTIKEL</b>	

## DAFTAR TABEL

Tabel 2.1 : Karakteristik dan fungsi segmen genom RNA virus Influeza A 7



## DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1. Struktur virus Influenza A .....	6
Gambar 2.2. Struktur genom virus Influenza A .....	8
Gambar 2.3: Siklus hidup virus influenza A .....	10
Gambar 2.4. Peta plasmid pBluesript II KS (-) .....	22
Gambar 2.5. Peta plasmid pcDNA3.1/His A .....	23
Gambar 3.1. Alur tahap pengsubklonaan fragmen BSF, IRES MLV, IRESHIV, HA ke dalam vektor pcDNA3.1/His-NA .....	27
Gambar 4.1. Analisis hasil pemotongan pKS-IRESHIV# 2 .....	44
Gambar 4.2. Analisis hasil pemotongan pKS-IRESHIV# 2 dengan enzim restriksi endonuklease EcoRV .....	45
Gambar 4.3. Analisis hasil purifikasi fragmen BSF <i>blunt</i> dan QG-MLV <i>Blunt</i> .....	45
Gambar 4.4. Identifikasi plasmid mengandung DNA sisipan .....	46
Gambar 4.5. Analisis hasil pemotongan pKS-IRESHIV# 2-bsf dengan enzim restriksi endonuklease BamHI .....	47
Gambar 4.6. Skema pasangan primer reaksi PCR <i>hot star</i> pada plasmid pkS-IRESHIV# 2 .....	48
Gambar 4.7. Identifikasi klon pKSIRESHIV-bsf # 1, 3 dan 4 menggunakan reaksi PCR <i>hot star</i> .....	49
Gambar 4.8. Analisis hasil pemotongan pKS-IRESMLV dengan enzim restriksi endonuklease HindIII .....	50
Gambar 4.9. Analisis hasil pemotongan pcDNA3.1/HisA-NA dengan enzim restriksi HindIII .....	50
Gambar 4.10a. Identifikasi plasmid mengandung DNA sisipan .....	51
Gambar 4.10b. Identifikasi plasmid mengandung DNA sisipan .....	52
Gambar 4.11a. Analisis hasil pemotongan pcDNA3.1/HisA- IRESMLV-NA dengan enzim restriksi endonuklease EcoRV ..	53
Gambar 4.11b. Analisis hasil pemotongan pcDNA3.1/HisA- IRESMLV-NA dengan enzim restriksi endonuklease EcoRV ..	54
Gambar 4.11c. Analisis hasil pemotongan pcDNA3.1/HisA- IRESMLV-NA dengan enzim restriksi endonuklease EcoRV..	54
Gambar 4.11d. Analisis hasil pemotongan pcDNA3.1/HisA- IRESMLV-NA dengan enzim restriksi endonuklease EcoRV..	55

Gambar 4.12a dan 4.12b.. Analisis hasil pemotongan klon pcDNA3.1/HisA IRESMLV-NA dengan enzim restriksi endonuklease HindIII	56
Gambar 4.13. Analisis klon pcDNA3.1/HisA-IRESMLV-NA dengan metode reaksi PCR <i>hotstar</i>	58
Gambar 4.14. Analisis klon pcDNA3.1/HisA-IRESMLV-NA dengan metode reaksi PCR <i>hotstar</i>	58
Gambar 4.15. Analisis hasil pemotongan plasmid rekombinan pKS-IRESHIV-bsf # 1 dengan enzim restriksi XhoI dan NotI	59
Gambar 4.16. Analisis hasil pemotongan vektor pcDNA3.1/HisA-IRES MLV-NA # 1 dengan enzim restriksi NotI dan EcoRV	60
Gambar 4.17a. Identifikasi plasmid mengandung DNA sisipan	61
Gambar 4.17b Identifikasi plasmid mengandung DNA sisipan	62
Gambar 4.18. Analisis hasil pemotongan pcDNA3.1/HisA-IRESMLV-NA-IRESHIV-bsf dengan enzim restriksi KpnI dan Xba	63
Gambar 4.19. Analisis klon pcDNA3.1/HisA-IRESMLV-NA-IRESHIV-bsf dengan metode reaksi PCR <i>hotstar</i>	64
Gambar 4.20. Analisis klon pcDNA3.1/HisA-IRESMLV-NA-IRESHIV-bsf dengan metode reaksi PCR <i>hotstar</i>	65
Gambar 4.21. Analisis hasil pemotongan pcDNA5/FRT-HA-sc#10	66
Gambar 4.22. Analisis hasil pemotongan pcDNA3.1/HisA-IRESMLV-NA-IRESHIV-bsf #17	66
Gambar 4.23. Identifikasi fragmen yang diisolasi dari gel LMA	67
Gambar 4.24 Identifikasi plasmid mengandung DNA sisipan	68
Gambar 4.25a. Analisis hasil pemotongan klon pcDNA3.1/His A-IRESMLV-NA-IRESHIV- bsf-HA dengan enzim restriksi ApaI	69
Gambar 4.25b. Analisis hasil pemotongan klon pcDNA3.1/His A-IRESMLV-NA-IRESHIV- bsf-HA dengan enzim restriksi ApaI	70
Gambar 4.26a. dan 4.26b. Analisis hasil pemotongan klon dengan enzim Xba	71
Gambar 4.27. Struktur klon pcDNA3.1/HisA-IRES MLV-NA-IRES HIV-HA	79

## DAFTAR SINGKATAN

293T	: <i>Human embryonic kidney</i>
BSA	: <i>Bovine serum albumin</i>
BSF	: <i>Blocking sequence fragment</i>
BSL 3	: <i>Biosafety level 3</i>
CIP	: <i>Calf internal phosphatase</i>
CMV	: <i>Cytomegalovirus</i>
CTL	: <i>Cytotoxic T lymphocyte</i>
DNA	: <i>Deoxyribonucleic acid</i>
HA	: <i>Hemagglutin</i>
HIV	: <i>Human Immunodeficiency virus</i>
HPAI	: <i>High pathogenic avian influenza</i>
IL-6	: <i>Interleukin-6</i>
INF- $\alpha$	: <i>Interferon-<math>\alpha</math></i>
IRES	: <i>Internal ribosome entry site</i>
KLB	: <i>Kejadian luar biasa</i>
LB	: <i>Luria Bertani</i>
LMA	: <i>Low melting agar</i>
LPAI	: <i>Low pathogenic avian influenza</i>
M	: <i>Matrix</i>
MDCK	: <i>Madine-Darbine Canine Kidney</i>
MHC	: <i>Major Histocompatibility</i>
MLV	: <i>Murine Leukimia virus</i>
NA	: <i>Neuraminidase</i>
NP	: <i>Nucleocapsid protein</i>
NTR	: <i>Non translated region</i>
PA	: <i>Polymerase acidic protein</i>
PB1	: <i>Polymerase basic protein 1</i>
PB2	: <i>Polymerase basic protein 2</i>
PCR	: <i>Polymerase chain reaction</i>
RNA	: <i>Ribonucleic acid</i>

SD	: <i>Splicing donor</i>
Sf9	: <i>Spodoptera frugiperda</i>
SV40	: <i>Simian virus 40</i>
TNF- $\alpha$	: <i>Tumor necrosis factor-<math>\alpha</math></i>
VLP	: <i>Virus like particles</i>
vRNP	: <i>Virion ribonucleoprotein</i>
WHO	: <i>World Health Organization</i>

### DAFTAR SINGKATAN NUKLEOTIDA

A	: Adenin
C	: sitosin
G	: Guanin
T	: Timin
U	: Urasil



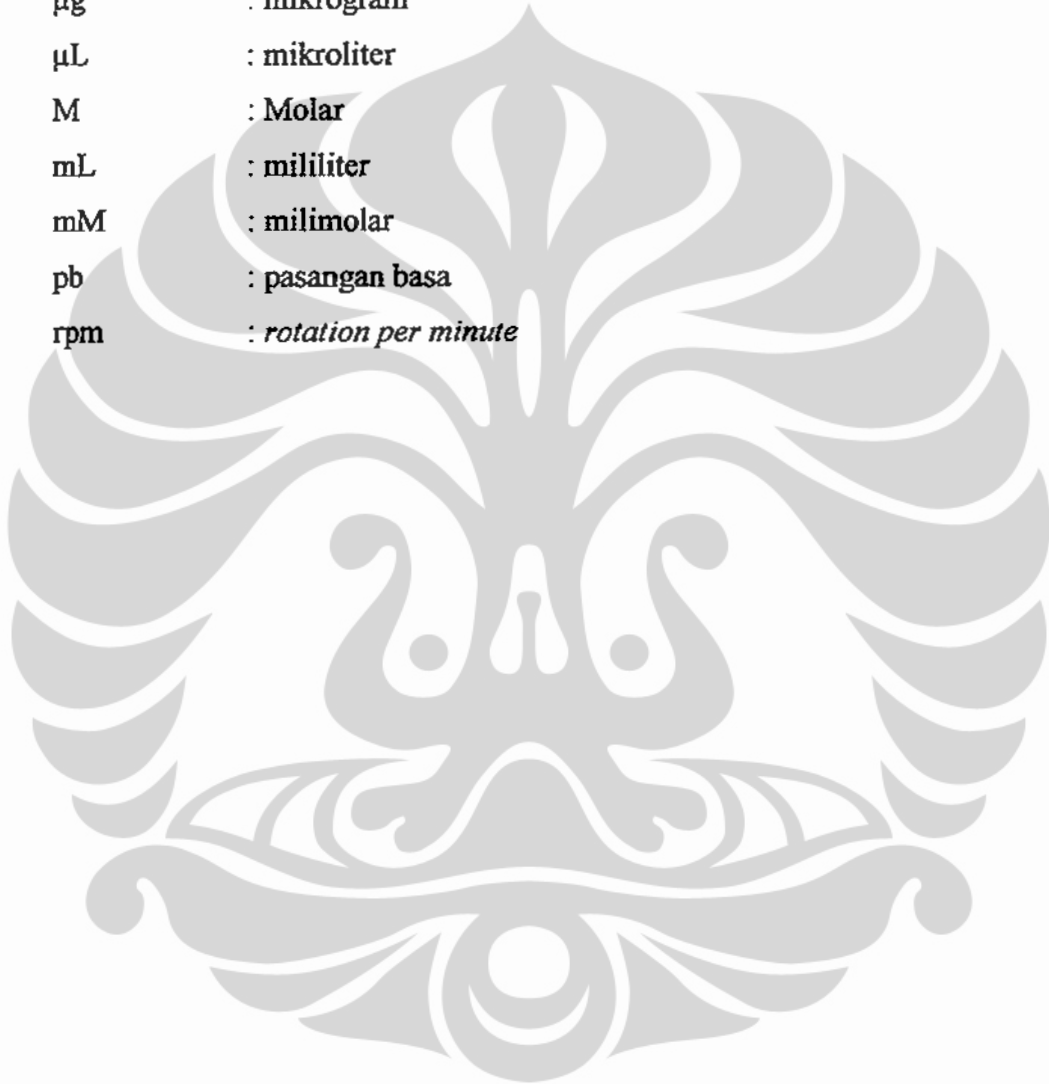
## DAFTAR SINGKATAN ASAM AMINO



A	: Alanin (Ala)
C	: Sistein (Cys)
D	: Asam Aspartat (Asp)
E	: Asam Glutamat (Glu)
F	: Fenilalanin (Phe)
G	: Glisin (Gly)
H	: Histidin (His)
I	: Isoleusin (Ile)
K	: Lysin (Lysin)
L	: Leusin (Leu)
M	: Metionin (Met)
N	: Asparagin (Asn)
P	: Prolin (Pro)
Q	: Glutamin (Gln)
R	: Arginin (Arg)
S	: Serin (Ser)
T	: Threonin (Thr)
V	: Valin (Val)
W	: Triptofan (Trp)
Y	: Tirosin (Tyr)

## DAFTAR LAMBANG

%	: persen
$\lambda$	: lambda
°C	: derajat Celsius
$\mu\text{g}$	: mikrogram
$\mu\text{L}$	: mikroliter
M	: Molar
mL	: mililiter
mM	: milimolar
pb	: pasangan basa
rpm	: <i>rotation per minute</i>



## DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. Hasil <i>sequencing</i> klonasi pcDNA3.1/His A- IRES MLV-NA-bsf-IRES HIV-HA # 6 dengan primer N1R320 .....	90
Lampiran 2. Homologi asam amino NA isolat dari ayam A/chicken /Indonesia/Jpf-001/07 (H5N1) .....	91
Lampiran 3a: Arah orientasi dan susunan nukleotida IRES MLV hasil <i>sequencing</i> dengan primer N1R320 dalam klonasi pcDNA3.1/HisA-IRES MLV-NA- bsf-IRES HIV-HA # 6 .....	93
Lampiran 3b: Arah orientasi serta susunan nukleotida dan asam amino NA dari isolat ayam A/chicken/Indonesia/Jpf-001/07 (H5N1) hasil <i>sequencing</i> dengan primer N1R320 dalam klonasi pcDNA3.1/HisA-IRES MLV-NA-IRES-bsf -HIV-HA #6 .....	94
Lampiran 4. Hasil <i>sequencing</i> klonasi pcDNA3.1/His A- IRES MLV-NA-bsf-IRES HIV-HA # 6 dengan primer H1413F .....	95
Lampiran 5. Homologi asam amino HA isolat dari ayam A/chicken /Indonesia/Jpf-001/07 (H5N1) .....	96
Lampiran 6a: Arah orientasi dan susunan nukleotida IRES HIV hasil <i>sequencing</i> dalam klonasi pKS-IRES HIV .....	98
Lampiran 6b: Arah orientasi serta susunan nukleotida dan asam amino HA dari isolat ayam A/chicken/Indonesia/Jpf-001/07 (H5N1) hasil <i>sequencing</i> dengan primer H1413F dalam klonasi pcDNA3.1/HisA-IRES MLV-NA-IRES-bsf -HIV-HA #6 .....	99

# BAB 1

## PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang Penelitian

Virus influenza A dapat menginfeksi berbagai jenis hewan, misalnya unggas, babi, kuda, mamalia yang hidup di air, dan manusia. Virus influenza A dibedakan ke dalam beberapa subtipe berdasarkan perbedaan genetik dan antigenik. Berdasarkan keparahan penyakit yang ditimbulkan virus influenza A pada ayam, diketahui ada dua kelompok, yaitu virus *high pathogenic avian influenza* (HPAI) dan *low pathogenic avian influenza* (LPAI). Virus Influenza A kelompok HPAI mengandung glikoprotein HA subtipe H5 dan H7, sedangkan yang memiliki glikoprotein HA selain subtipe H5 dan H7 dimasukkan ke dalam kelompok virus LPAI.<sup>18</sup> Sebagian besar virus influenza LPAI dapat menyebabkan infeksi, tetapi tidak menyebabkan kematian. Virus influenza yang patogenik (HPAI), yaitu galur H5N1 dapat menyebabkan infeksi sistemik, sehingga mengakibatkan kematian yang mencapai 100% pada peternakan. Virus tersebut menyebabkan infeksi saluran pernafasan akut pada manusia dan infeksi saluran pencernaan pada burung. Selain virus influenza A kelompok HPAI menyebabkan morbiditas dan mortalitas pada manusia, dapat juga berdampak pada kehidupan sosial dan ekonomi seluruh dunia.

Peningkatan penyakit infeksi virus HPAI pada peternakan domestik dan bertambahnya jumlah kasus transmisi langsung virus influenza burung dengan subtipe yang berbeda pada manusia dapat menjadi ancaman potensial terjadinya pandemi.<sup>18</sup> Mekanisme munculnya galur virus influenza baru dan faktor epidemiologi menyebabkan pandemi ini tidak dapat diprediksi. Kejadian luar biasa (KLB) infeksi virus influenza burung yang disebabkan virus influenza A H5N1 pada manusia terjadi di Hong Kong pada tahun 1997. Pada KLB ini pertama kali diketahui adanya transmisi langsung virus influenza dari unggas di peternakan ke manusia, menyebabkan 6 orang meninggal dari 18 orang yang terinfeksi virus influenza A H5N1. Pada akhir tahun 2003 dan awal tahun 2004 terjadi lagi KLB infeksi virus influenza A H5N1 di 8 negara Asia, yaitu China,

Berdasarkan laporan *World Health Organization* (WHO) pada tanggal 23 Maret 2009, kasus infeksi virus influenza A H5N1 yang terjadi di Indonesia menyebabkan kematian 115 orang dari 141 orang yang terinfeksi virus.<sup>4</sup>

Dengan meningkatnya angka kejadian morbiditas dan mortalitas akibat infeksi *highly pathogenic avian influenza* A (HPAI) pada manusia, pada bulan Agustus 2006, WHO menyarankan tiap negara untuk mengembangkan kandidat vaksin dari isolat galur virus influenza A H5N1.<sup>5</sup> Vaksin influenza A H5N1 saat ini belum ada tersedia di pasaran. Vaksin influenza yang tersedia merupakan vaksin virus yang dilemahkan dan diproduksi pada telur ayam berembrio.<sup>21</sup> Kelemahan produksi vaksin menggunakan telur ayam berembrio adalah reaksi alergi telur, derajat keselamatan harus dilakukan dalam laboratorium *Biosafety level 3* (BSL 3) dan keterbatasan pada penyediaan telur ayam berembrio, terutama jika terjadi pandemi influenza A. Selain virus dilemahkan, vaksin Influenza A H5N1 juga telah dikembangkan beberapa jenis vaksin lain seperti vaksin DNA<sup>18</sup>, *Virus like particle* (VLP)<sup>9, 43</sup>, *reverse genetic*.<sup>11, 12</sup>

*Virus like particle* adalah hasil perakitan protein virus berupa struktur menyerupai virus yang tidak mengandung asam nukleat yang diperlukan untuk replikasi virus, sehingga tidak infeksius. Oleh karena VLP tidak infeksius dan tidak onkogenik, maka struktur semacam ini cocok untuk dikembangkan sebagai kandidat vaksin Influenza A H5N1. Selain VLP memiliki struktur mirip virion asli, VLP juga mempunyai kemampuan untuk menimbulkan respon imun humoral dan selular.<sup>7</sup> Teknologi dengan sistem VLP untuk produksi vaksin sudah banyak dikembangkan, karena metode ini lebih cepat dan lebih efektif dibandingkan dengan teknologi lama, serta dapat diproduksi dalam skala besar dan tidak memerlukan fasilitas BSL 3.<sup>7</sup> Keuntungan lain, teknologi VLP dapat dikembangkan untuk terapi gen atau *drug delivery*.<sup>8</sup>

Pada penelitian ini dikembangkan konstruksi vektor pengeksresi yang mengandung fragmen glikoprotein *hemagglutinin* (HA) dan *neuraminidase* (NA) dari virus Influenza A subtipe H5N1. Glikoprotein HA merupakan determinan antigen yang berperan penting untuk induksi antibodi netralisasi yang dapat menghambat penempelan virus pada reseptor asam sialat dalam proses replikasi virus.<sup>19</sup> Oleh karena itu, HA digunakan sebagai komponen esensial pada

pembuatan vaksin.<sup>19</sup> Selain berperan pada pelepasan virus progeni pada sel yang diinfeksi. Glikoprotein NA juga merupakan determinan antigen untuk induksi antibodi netralisasi melalui pemecahan glikosida yang berikatan pada asam sialat pada sel hospes dan permukaan virion. Glikoprotein ini mencegah terjadinya agregasi virion dan memfasilitasi pelepasan virus progeni dari sel yang diinfeksi.<sup>19</sup>

Berdasarkan penelitian Chen et al tahun 2007, pembentukan VLP sebagai kandidat vaksin influenza memerlukan HA dan aktifitas sialidase NA atau *exogenous* NA. Glikoprotein HA hanya diekspresikan di dalam sel dan dilepaskan dari sel karena aktifitas sialidase. Dengan demikian, pelepasan HA memerlukan ekspresi dari protein lain, yaitu NA.<sup>10</sup>

Komposisi molekul HA dan NA pada *envelope* bervariasi dengan rasio HA berbanding NA berkisar 4:1 sampai 5:1 dan terdapat 500 tonjolan pada lapisan luar selubung, sehingga protein NA selalu lebih sedikit dibanding dengan protein HA.<sup>1</sup> Penggunaan NA sebagai komponen vaksin memiliki efek protektif sebagai akibat perangsangan imun spesifik, respon seluler dan humoral. Peningkatan jumlah molekul protein NA pada vaksin VLP, kemungkinan dapat meningkatkan respon imun spesifik yang ditimbulkan oleh vaksin tersebut. Salah satu cara yang mungkin dapat meningkatkan jumlah molekul NA yang terikat dalam VLP adalah dengan menyetarakan jumlah protein NA dan HA yang terekspresi dalam sel produsen VLP. Hal ini mungkin dapat dicapai dengan menempatkan susunan nukleotida IRES pada hulu *open reading frame* (ORF) penyandi protein NA dan HA.

Konstruksi vektor pengeksresi fragmen HA-NA dibuat dengan cara menyisipkan *internal ribosome entry site* (IRES) *Murine Leukimia virus* (MLV) pada daerah hulu kodon inisiasi NA dan IRES *Human Immunodeficiency virus* (HIV) pada daerah hulu fragmen HA. Pada posisi di antara gen NA dan gen IRES HIV disisipkan susunan nukleotida *blocking sequence fragment* (BSF) yang digunakan untuk mencegah terjadinya proses reinisiasi setelah terminasi translasi.

Dua macam IRES yang digunakan pada penelitian ini, termasuk dalam famili Retroviridae, dimana IRES HIV ditemukan pada virus HIV tipe I dari genus Lentivirus, sedangkan IRES MLV pada virus MLV dari genus Gammaretrovirus. Melalui mekanisme IRES, mRNA dapat melakukan proses translasi protein tanpa

melalui mekanisme *scanning*. Pada umumnya mRNA sel eukariot hanya melakukan translasi satu macam protein, dimana proses translasi tergantung pada struktur *bertudung* pada bagian ujung 5' yang disebut *non translated region* (NTR). Hal ini berbeda dengan mRNA beberapa virus, seperti HIV, dimana proses translasi protein tidak melibatkan NTR, namun melalui IRES. Elemen IRES dapat digunakan untuk membentuk mRNA bisistronik yang dapat melakukan translasi 2 macam protein yang berbeda. Dengan demikian, hasil pengklonaan fragmen IRES MLV-NA-IRES HIV-HA ke dalam vektor pengeksresi diharapkan dapat mengekspresikan protein HA dan NA, apabila ditransfeksi pada sel mamalia. Hasil penelitian ini akan dikembangkan untuk pembuatan *virus like particles* (VLP) sebagai kandidat vaksin.

Penelitian mengenai penggunaan fragmen IRES HIV dan IRES MLV untuk konstruksi vektor pengeksresi glikoprotein HA-NA virus Influenza A H5N1 belum dilakukan di Indonesia. Hasil penelitian ini diharapkan dapat bermanfaat dalam pengembangan pembuatan kandidat vaksin virus influenza A H5N1.

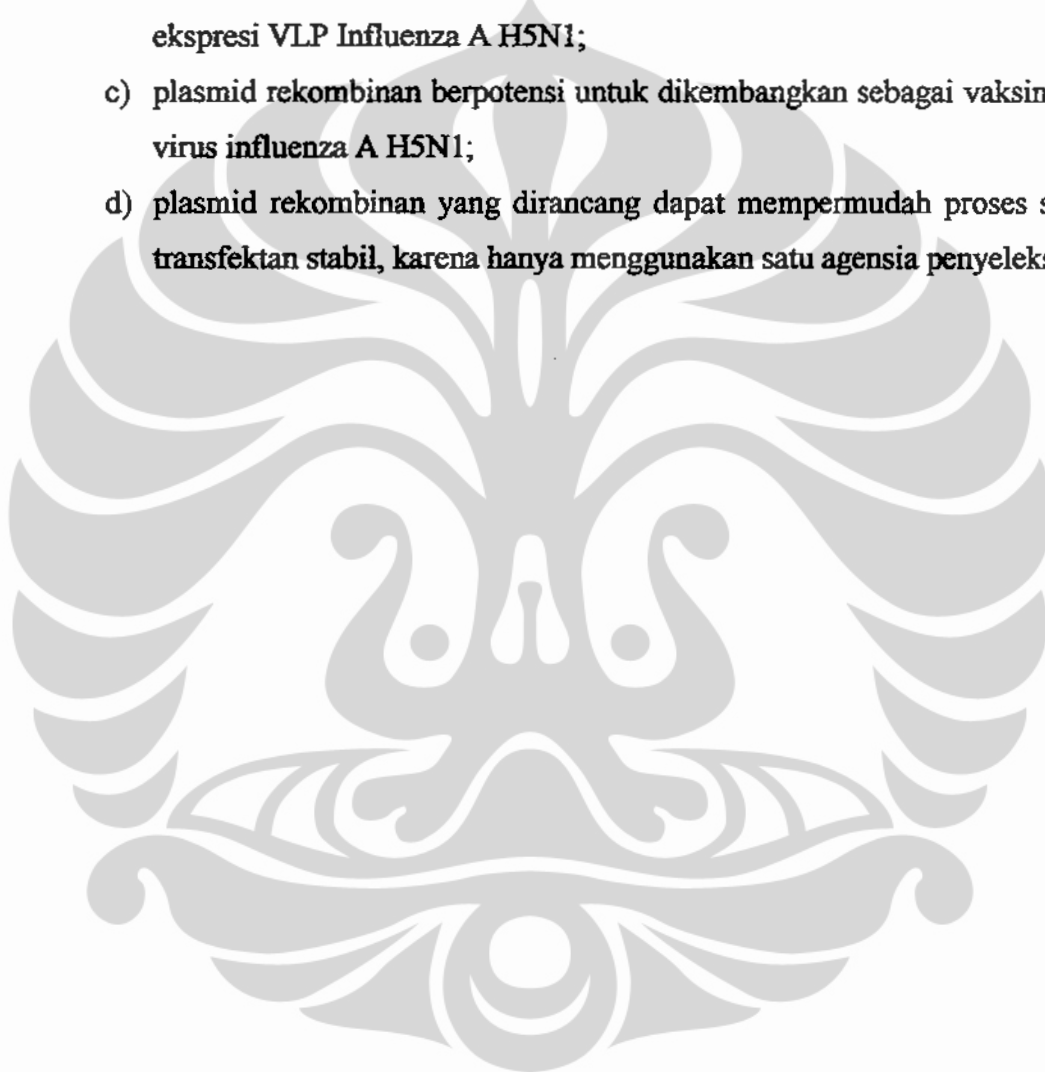
## 1.2 Tujuan Penelitian

Tujuan umum penelitian ini adalah untuk mendapatkan prototipe plasmid rekombinan pengeksresi mRNA bisistronik untuk translasi protein HA dan NA virus influenza A H5N1 dalam bentuk VLP pada sel mamalia, dengan rasio jumlah molekul NA berbanding HA lebih tinggi dari rasio NA berbanding HA pada partikel virus infeksius. Tujuan khusus, yaitu mendapatkan klon plasmid yang mengandung fragmen-fragmen IRES MLV, NA, IRES HIV dan HA secara berurutan dari arah 5' ke arah 3' dalam satu vektor, melalui mRNA bisistronik yang mengandung susunan nukleotida penyandi NA pada hilir IRES MLV dan susunan nukleotida penyandi HA pada hilir IRES HIV. Konstruksi plasmid pengeksresi tersebut diharapkan dapat mengekspresikan protein HA dan NA virus Influenza A H5N1 secara bersamaan pada sistem ekspresi mamalia dan juga pada fase G2 / mitosis.

### 1.3. Manfaat Penelitian

Manfaat yang dapat diperoleh dari penelitian ini, antara lain:

- a) plasmid rekombinan yang dihasilkan dapat untuk produksi protein HA dan NA dalam bentuk VLP virus Influenza A H5N1;
- b) plasmid rekombinan hasil penelitian ini dapat digunakan untuk mempelajari pengaruh sisipan IRESMLV dan IRESHIV terhadap tingkat ekspresi VLP Influenza A H5N1;
- c) plasmid rekombinan berpotensi untuk dikembangkan sebagai vaksin DNA virus influenza A H5N1;
- d) plasmid rekombinan yang dirancang dapat mempermudah proses seleksi transfektan stabil, karena hanya menggunakan satu agensia penyeleksi.





## BAB 2

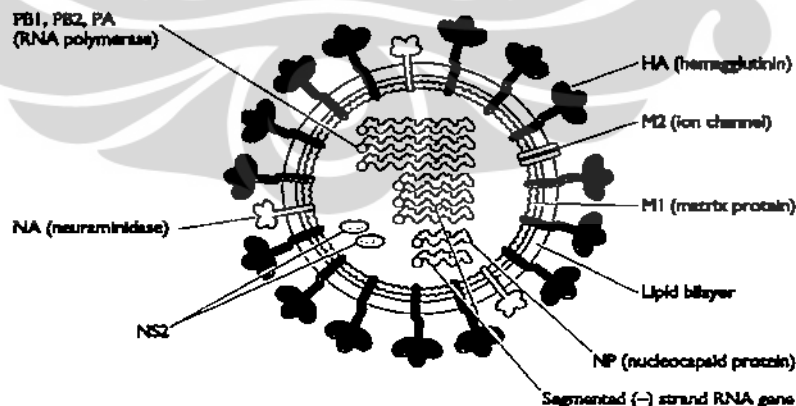
### TINJAUAN PUSTAKA

#### 2.1 VIRUS INFLUENZA

Virus influenza termasuk dalam anggota famili Orthomyxoviridae merupakan virus RNA yang terdiri 4 genus, yaitu virus Influenza A, virus Influenza B, virus Influenza C dan Thogotovirus. Burung-burung akuatik merupakan resevoir alami terbesar virus influenza A. Namun demikian, virus influenza A dapat menginfeksi dan menyebabkan penyakit pada unggas di peternakan, babi dan beberapa spesies mamalia lain, termasuk manusia.<sup>1, 2, 18</sup> Perbedaan virus influenza A, B dan C dapat dilihat berdasarkan antigenik pada protein nukleokapsid (NP) dan matrik (M). Virus influenza A dapat menginfeksi manusia, spesies burung, dan spesies mamalia lainnya, termasuk babi dan kuda. Virus influenza B di alam hanya menginfeksi manusia, sedangkan virus influenza C selain menginfeksi manusia dapat juga menginfeksi babi. Virus influenza A dan B mengandung 8 segmen *ribonucleic acid* (RNA), sedangkan influenza C mempunyai 7 segmen RNA.<sup>1,19</sup>

##### 2.1.1 Struktur dan genom virus Influenza A

Virion influenza A mempunyai selubung (*envelop*), mengandung 8 segmen serat tunggal, RNA *sense* negatif, yang mengkode 11 polipeptida<sup>1,40</sup> (gambar 2.1).



Gambar 2.1: Struktur virus Influenza A.

Flint, 2000.<sup>40</sup>

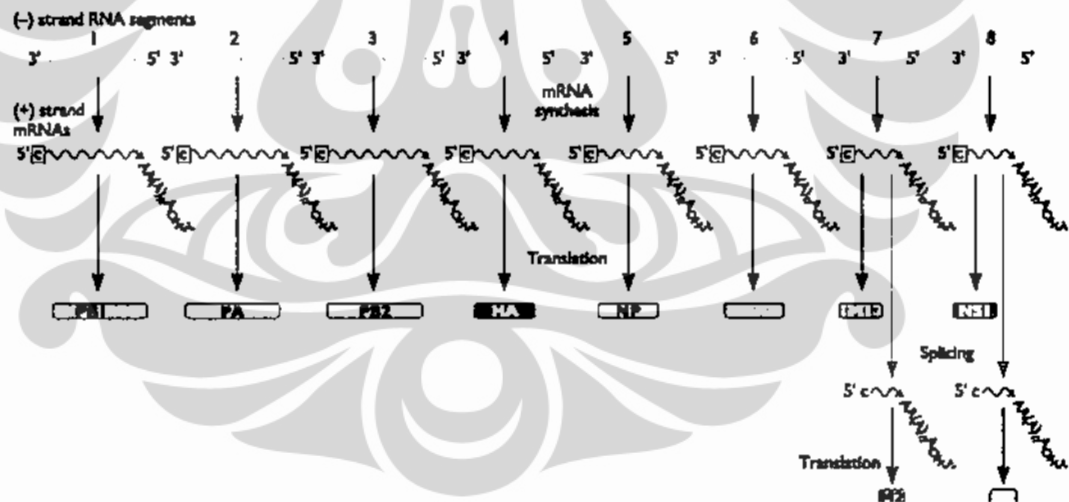
Karakteristik dan fungsi segmen genom RNA virus Influenza A (tabel 2.1 dan gambar 2.2).

Tabel 2.1 Karakteristik dan fungsi segmen genom RNA virus Influeza A.<sup>1</sup>

Segmen	Protein	Panjang mRNA (Nukleotida) Panjang aa	Lokasi	Ciri-ciri dan Fungsi
1	PB2 ( <i>polymerase basic protein 2</i> )	2.320 759 aa	Dalam membran virion	Protein polimerase; menginfeksi inti sel; komponen transkripsi dan replikasi RNA
2	PB1 ( <i>polymerase basic protein 1</i> )	2.320 757 aa	Dalam membran virion	Protein polimerase; menginfeksi inti sel; komponen transkripsi dan replikasi RNA
3	PA ( <i>polymerase acidic protein</i> )	2.211 716 aa	Dalam membran virion	Protein polimerase komponen transkripsi dan replikasi RNA
4	HA ( <i>hemagglutinin</i> )	1.757 566 aa	Pada selubung virion	Glikoprotein pada selubung, penempelan virus pada reseptor permukaan sel, perakitan virus
5	NP	1.540 498 aa	Dalam membran virion	Protein struktural utama; Berinteraksi dengan 3 protein polimerase RNA (PB1, PB2 dan PA) membentuk RNP.
6	NA ( <i>neuraminidase</i> )	1.392 454 aa	Pada selubung virion	Protein utama virion; glikoprotein pada selubung; enzim.
7	M1 ( <i>polipeptida</i> )	1.005 252 aa	Pada bagian bawah lipid lapis ganda	Protein matrik; komponen utama virion, berinteraksi dengan RNP dan NS; perakitan virus.
	M2	315 97 aa	Pada selubung virion	Protein membran integral; berfungsi sebagai pengaktivasi pH pada saluran ion yang memungkinkan <i>acidification</i>

Segmen	Protein	Panjang mRNA (Nukleotida)	Panjang aa	Lokasi	Ciri-ciri dan Fungsi
M2 (lanjutan)				interior virion selama proses <i>uncoating virion</i> .	
8	NS1	868	230 aa	Sitoplasma	Jumlah berlimpah; protein nonstruktural; menghambat pemecahan pra-mRNA 3' dan menghambat ekspor nuklear mRNA
	NS2 (polipeptida)	395	121 aa	Sitoplasma; nukleus	Komponen minor virion; protein nonstruktural fungsi belum diketahui; berasal dari <i>splicing</i> mRNA

Lamb RA, et al. 2001<sup>1</sup>



Gambar 2.2. Struktur genom virus Influenza A.

Flint. 2000.<sup>40</sup>

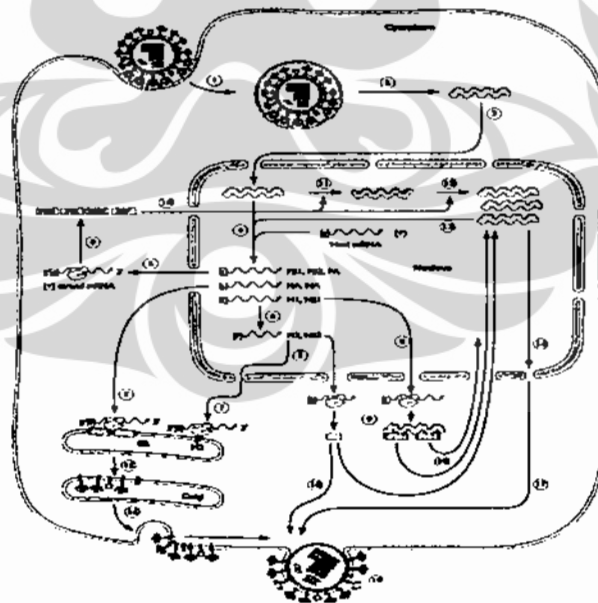
Virion dikelilingi oleh membran lipid yang mengandung glikoprotein utama.<sup>17</sup> Glikoprotein yang terdapat pada permukaan virus influenza merupakan dua determinan antigen utama, yaitu hemagglutinin (HA) dengan 16 subtype (H1-H16)

dan neuraminidase (NA) dengan 9 sub tipe (N1-N9).<sup>6</sup> Partikel virus influenza mempunyai ukuran diameter 80 – 120 nm, dimana terdapat kira-kira 500 tonjolan pada lapisan luar selubung dengan ukuran 10 – 14 nm. Dua tipe tonjolan adalah glikoprotein HA mempunyai bentuk seperti batang dan NA berbentuk seperti jamur.<sup>1</sup> Glikoprotein HA disintesis sebagai polipeptida tunggal (HA<sub>0</sub>), kemudian dipecah oleh enzim protease menjadi dua rantai disulfida, yaitu HA<sub>1</sub> dan HA<sub>2</sub>, yang penting untuk penggabungan peptida hidrofobik.<sup>2</sup> Selain itu, pemecahan HA juga diperlukan dalam penentuan infektivitas dan sebagai determinan penting terhadap patogenesis virus.<sup>2,17</sup> Sejumlah asam amino pada situs pemecahan HA<sub>0</sub> dan penyebaran enzim protease pada sel hospes merupakan faktor utama yang mempengaruhi tropisme jaringan, penyebaran sistemik dan patogenesis virus influenza.<sup>20</sup> Protein HA pada permukaan virus, berperan untuk penempelan virus pada sel hospes melalui interaksi dengan asam sialat yang terdapat pada reseptor sel hospes dan untuk tempat fusi selubung virus dengan membran endosom, selama virus *uncoating*. Oleh karena itu, HA merupakan determinan antigen yang sangat penting untuk induksi antibodi netralisasi secara langsung yang dapat menghambat penempelan virus pada reseptor asam sialat dalam proses replikasi virus.<sup>19</sup> Neuraminidase merupakan sialidase yang memecah residu asam sialat dari permukaan sel hospes dan permukaan virion serta berperan penting untuk mengatur pelepasan virus dari sel yang terinfeksi.<sup>1,19</sup> Glikoprotein NA juga merupakan determinan antigen untuk induksi antibodi netralisasi melalui pemecahan glikosida yang berikatan pada asam sialat pada sel hospes dan permukaan virion. Glikoprotein ini mencegah terjadinya agregasi virion dan memfasilitasi pelepasan virus progeni dari sel yang diinfeksi.<sup>19</sup>

### 2.1.2 Siklus hidup virus Influenza A H5N1

Dalam perkembangan hidup virus Influenza A, reseptor yang mengandung asam sialat  $\alpha 2,3$  atau  $\alpha 2,6$  pada glikoprotein atau glikolipid permukaan sel hospes berperan pada proses pengikatan virus. Reseptor pada saluran pencernaan unggas mengandung asam sialat  $\alpha 2,3$  dan pada saluran pernafasan babi diketahui mengandung asam sialat  $\alpha 2,3$  dan  $\alpha 2,6$ . Pada sel epitel saluran pernafasan manusia mengandung asam sialat  $\alpha 2,6$ .<sup>1</sup>

Pola replikasi virus Influenza A H5N1 belum dapat diidentifikasi secara lengkap, namun hasil studi tahun 1997 pada pasien rawat inap penderita Influenza A H5N1, menunjukkan RNA virus dapat dideteksi dari isolat nasofaring dan dari sampel feses pasien yang diare. Dengan demikian, selain dapat bereplikasi pada saluran pernafasan, virus influenza A H5N1 dapat juga bereplikasi pada saluran gastrointestinal manusia.<sup>23</sup> Pola replikasi virus Influenza A dimulai ketika HA virus berikatan dengan reseptor asam sialat pada permukaan sel hospes dan ikatan ini menginisiasi masuknya virus ke dalam sel hospes melalui proses endositosis. Pada proses ini partikel virus dikelilingi oleh membran plasma sel hospes sehingga terjadi pembentukan vesikel endositik. Virus masuk ke dalam endosom sel hospes, terjadi penggabungan membran virus dan membran endosom yang diaktivasi pada kondisi pH sedikit asam di dalam endosom. Kemudian RNA virus dikirim ke dalam inti sel hospes, terjadi sintesis mRNA dan replikasi RNA virus. Ribonukleoprotein virion (vRNP) yang baru dibentuk di dalam inti sel, dibawa keluar ke sitoplasma. Translasi membran protein di dalam retikulum endoplasma. Progeni virus dirakit pada membran plasma sel hospes dan kemudian terjadi penonjolan / tunas progeni virus yang baru (Gambar 2.3).



Gambar 2.3: Siklus hidup virus influenza A.

Flint, 2000.<sup>40</sup>

### 2.1.3 Patogenesis Influenza A H5N1

Berdasarkan studi patogenesis virus Influenza A pada manusia, baik secara alamiah maupun eksperimental memperlihatkan bahwa setelah virus menginfeksi sel hospes akan bereplikasi melalui saluran pernafasan dari atas ke bawah. Infeksi virus Influenza A menyebabkan perubahan patologik sepanjang saluran pernafasan, terutama pada saluran pernafasan bawah.<sup>22,23</sup>

Hasil studi dari isolat nasofaring pasien penderita Influenza A H5N1 di Hong Kong pada tahun 1997, memperlihatkan bahwa virus dapat dideteksi pada kisaran waktu 1 sampai 16 hari. Kasus pada pasien di Thailand menunjukkan interval waktu 3 sampai 16 hari, dari gejala sakit sampai diperoleh hasil kultur positif pada hari pertama. Deteksi sampel feses pasien penderita diare ditemukan adanya RNA virus, hal ini menunjukkan virus influenza A H5N1 dapat menginfeksi saluran gastrointestinal pada manusia.<sup>23</sup>

### 2.1.4 Respon imun sel hospes terhadap infeksi virus Influenza A H5N1

Saluran pernafasan sel hospes mempunyai mekanisme pertahanan melawan infeksi virus Influenza, seperti lapisan mukus, silia dan inhibitor protease. Pada respon imun alami, sistem pertahanan barrier ini dapat menghambat masuknya virus dan pelepasan selubung virus. Ketika sel epitel diinfeksi oleh virus, maka sel akan menghasilkan dan melepaskan sitokin proinflamatori, seperti interleukin-6 (IL-6) dan interferon- $\alpha$  (INF- $\alpha$ ).<sup>21,22</sup> Hasil eksperimen pada hewan coba yang diinfeksi virus Influenza A, diketahui bahwa IL-6 dan INF- $\alpha$  mencapai puncaknya dua hari setelah infeksi secara eksperimental. Pelepasan kedua sitokin mempunyai kesesuaian dengan nilai gejala klinis tertinggi, produksi mukus, demam dan *viral load*.<sup>22</sup> Kemudian, setelah pelepasan IL-6 dan INF- $\alpha$ , di dalam sekresi saluran pernafasan atau serum ditemukan sitokin lain, yaitu IL-8, *tumor necrosis factor- $\alpha$*  (TNF- $\alpha$ ), atau IL- $\beta$ , IL-2 atau TGF- $\beta$  yang tidak meningkat.<sup>22</sup> Hasil pemeriksaan pasien pada peristiwa KLB infeksi virus Influenza A H5N1 tahun 1997 di Hong Kong, juga membuktikan bahwa darah pasien (individu) mengandung IL-6, TNF- $\alpha$ , INF- $\gamma$ , *soluble IL-2 reseptor*. Pada tahun 2003, dari hasil pemeriksaan darah pasien pada 3 hari sampai 8 hari setelah awitan, ditemukan tingkat kenaikan *chemokines interferon-inducible protein 10*,

*monocyte chemoattractant protein 1*, dan *monokine* yang dihasilkan  $\text{INF-}\gamma$ .<sup>23</sup> Penelitian lain memperlihatkan bahwa kadar mediator inflamatori (IL-6, IL-8, IL-1 dan *monocyte chemoattractant protein-1*) dalam plasma ditemukan lebih tinggi di antara pasien yang meninggal dibandingkan pasien yang selamat dan rata-rata kadar  $\text{INF-}\alpha$  dalam plasma sekitar 3 kali lebih tinggi di antara pasien terinfeksi Influenza A yang meninggal dibandingkan dengan pasien kontrol sehat.<sup>23</sup>

Diketahui ada dua pembagian efektor limfosit pada manusia, yaitu pertama terdiri dari sel-sel yang memediasi sitotoksisitas melalui antigen histokompatibilitas kelas I (MHC I), merupakan *cytotoxic T lymphocyte* (CTL) dengan fenotip  $\text{CD8}^+$  dan yang kedua melalui antigen histokompatibilitas kelas II (MHC II) yaitu sel T  $\text{CD4}^+$ .<sup>22, 47</sup> Infeksi virus Influenza A pada hospes dapat menimbulkan respon imun seluler yang menghasilkan CTL melalui antigen MHC kelas I. Berdasarkan beberapa hasil studi mengenai CTL, ditemukan bahwa target respon CTL terhadap infeksi virus Influenza A spesifik sesuai dengan protein virus, seperti protein HA, NP, matrik, NA dan polimerase.<sup>24</sup> Peran sel-sel CTL adalah melisis sel yang terinfeksi oleh virus Influenza A. Sel T  $\text{CD4}^+$  mempunyai dua fungsi, yang pertama sebagai sel T *helper* menyediakan bantuan pada sel B untuk memproduksi antibodi yang akan mengikat antigen virus.<sup>22</sup> Fungsi kedua dari sel T  $\text{CD4}^+$  adalah mempunyai aktifitas sitolitik yang mirip dengan CTL,<sup>22</sup> yaitu melalui aktivasi makrofag untuk menghancurkan antigen virus yang telah dimakan oleh makrofag.<sup>47</sup>

### 2.1.5 Transmisi virus Influenza A H5N1

Alur transmisi virus Influenza A H5N1 pada manusia dapat terjadi melalui berbagai cara, antara lain inhalasi droplet yang infeksius; kontak langsung; kontak secara tidak langsung (muntahan), terinfeksi pada saluran pernafasan atas atau mukosa konjungtiva. Kejadian infeksi virus Influenza H5N1 yang sering terjadi adalah melalui penyebaran dari unggas ke manusia, kemungkinan lain dari lingkungan ke manusia masih terbatas, dan transmisi dari manusia ke manusia tidak terjadi sampai saat ini. Berdasarkan laporan Departemen Kesehatan Mesir tanggal 1 Juni 2009, menyebutkan bahwa kasus Influenza A H5N1 yang terjadi

pada bulan Mei 2009 di Mesir disebabkan oleh kontak penderita dengan unggas yang mati dan sakit di peternakan.<sup>22, 23, 45</sup>

Infeksi virus Influenza A H5N1 melalui transmisi langsung dari ayam di peternakan ke manusia terjadi pertama kali di Hong Kong pada tahun 1997. Hasil investigasi membuktikan adanya pembentukan *reassortment* virus H5N1 yang diisolasi dari ayam dan manusia. Kombinasi pada gen memungkinkan virus dapat bertransmisi dari ayam ke manusia secara langsung dan menyebabkan penyakit yang berat dan mematikan pada manusia maupun ayam.<sup>22,23</sup>

Transmisi virus Influenza A (H5N1) dari manusia ke manusia yang pernah terjadi adalah dalam lingkungan keluarga (*family cluster*), dan satu kasus lain terjadi pada transmisi ibu – anak. Hasil studi di Hong Kong pada tahun 1997, menunjukkan bahwa transmisi manusia ke manusia tidak terjadi melalui kontak sosial. Studi serologi di Vietnam dan Thailand pada tahun 2004, memperlihatkan bahwa transmisi manusia ke manusia tidak terjadi melalui kontak antara pekerja kesehatan dengan pasien yang terinfeksi virus Influenza A H5N1.<sup>23</sup>

Bentuk transmisi dari lingkungan ke manusia yang memungkinkan dapat terjadi, antara lain terminum air kolam yang terkontaminasi oleh virus pada saat berenang, intranasal langsung atau masuk ke dalam konjungtiva selama terpapar air yang terkontaminasi. Model transmisi lain yang dapat menjadi faktor resiko, yaitu tangan terkontaminasi oleh muntahan, kemudian terjadi inokulasi dengan sendirinya dan penyebaran dari feses di peternakan yang tidak didesinfeksi.<sup>23</sup>

### 2.1.6 Epidemiologi

Penyebaran virus influenza burung yang disebabkan oleh virus influenza tipe A subtype H5N1 telah mencapai hampir seluruh dunia. Virus H5N1 yang menimbulkan HPAI, merupakan virus endemik pada itik dan populasi hewan di peternakan. Virus ini memiliki kemampuan untuk pindah dari burung akuatik ke hewan unggas dipeternakan dan kemudian beradaptasi pada manusia, sehingga dapat menimbulkan pandemi. Pandemi terjadi jika virus H5N1 bertransmisi dari manusia ke manusia, dan kejadian ini dapat menyebabkan jutaan manusia meninggal dalam kurun waktu 6 bulan sampai 12 bulan.<sup>21</sup> Virus influenza burung berbeda dengan virus-virus saluran pernafasan lainnya, hal ini karena ada variasi



antigenik pada kedua permukaan antigen virus Influenza A. Ada dua tipe variasi antigenik yang diketahui, yaitu *antigenic drift* dan *antigenic shift*. *Antigenic drift* terjadi apabila ada perubahan antigenik minor pada glikoprotein HA dan NA, yang berlangsung secara perlahan oleh karena akumulasi mutasi titik dan dapat menimbulkan epidemi. Sebaliknya, *antigenic shift* dapat menimbulkan pandemi galur virus baru, karena perubahan antigenik terjadi secara drastis yang membentuk *reassortment* genetik pada segmen genom virus Influenza A.<sup>22</sup>

### 2.1.7 Pengembangan Vaksin Influenza A H5N1

Salah satu upaya yang dilakukan untuk mengatasi terjadinya pandemi virus Influenza A H5N1 adalah pengembangan vaksin Influenza A dari isolat subtipe virus Influenza A H5N1.<sup>5</sup> Vaksinasi melawan virus Influenza A H5N1 diharapkan dapat mengurangi resiko infeksi virus terhadap kesehatan masyarakat pada saat terjadi pandemi. Oleh karena itu, tersedianya vaksin Influenza A H5N1 yang manjur dan aman dipakai pada manusia sangat dibutuhkan oleh dunia untuk mengatasi pandemi tersebut.

Penelitian mengenai metode pembuatan vaksin Influenza A isolat subtipe H5N1 telah dilakukan oleh para peneliti, antara lain: vaksin dari virus hidup (*live vaccines*), vaksin yang diinaktivasi (*inactivated vaccines*) dan vaksin VLP. Para peneliti membuat kandidat vaksin Influenza A H5N1 berdasarkan metode pembuatan vaksin influenza A subtipe lainnya (*seasonal flu vaccines*), dimana kandidat vaksin tersebut dikembangkan dengan sistem propagasi pada telur berembrio ataupun pada kultur sel.

#### 2.1.7.1 Metode propagasi pada telur berembrio

##### a) Vaksin Virus Hidup yang dilemahkan

Pembuatan vaksin virus hidup dapat dilakukan dengan cara merusak gen matriks (M2) atau membuat partikel virus kekurangan gen *nuclear export protein*. Penelitian vaksin virus hidup telah dilakukan pada hewan model, namun belum diketahui apakah vaksin yang dirusak sistem replikasinya dapat bekerja di dalam manusia.<sup>21</sup> Penelitian Subbarao K dan Murphy B pada tahun 2006 menggunakan hewan coba mencit dan *ferret*, memperlihatkan bahwa vaksin virus hidup dari

beberapa galur virus Influenza A H5N1 yang dilemahkan dapat bekerja dengan baik dan melindungi hewan coba dari infeksi virus Influenza A H5N1 yang mematikan.<sup>48</sup> Penemuan ini mendorong para peneliti untuk membuat vaksin berdasarkan salah satu galur tertentu dari virus Influenza A H5N1 yang dapat berpotensi untuk melindungi dari galur virus Influenza A H5N1 yang berbeda.<sup>48</sup>

#### b) Vaksin yang diinaktivasi

Salah satu jenis vaksin Influenza A H5N1 yang diinaktivasi, yaitu vaksin Influenza A H5N1 monovalen yang berasal dari galur A/Vietnam/1194/2004. Vaksin ini merupakan vaksin virion utuh yang diperlakukan dengan cara menghilangkan asam amino *polybasic* pada situs pemotongan, sehingga virulensi virus berkurang. Selanjutnya, virus *seed* dengan titer tinggi ditumbuhkan di dalam telur berembrio, diinaktivasi menggunakan formalin, dipurifikasi dan ditambahkan adjuvan aluminium hidroksida.<sup>21</sup>

Vaksin yang diinaktivasi dapat menghasilkan antibodi netralisasi pada protein permukaan dengan titer tinggi dan juga sel T CD8+. Peran sel T CD8+ yang dihasilkan dapat memberikan respon melawan antigen *conserved* yang berasal dari protein internal virus, yang mungkin dapat menjadi pelindung superior pada saat terjadi endemi atau pandemi virus Influenza A H5N1.<sup>21</sup> Namun demikian, pembuatan vaksin Influenza A H5N1 masih menghadapi kendala, karena varian genetik yang selalu dibawa pada saat transmisi antara manusia ke manusia belum diketahui.<sup>21</sup>

#### 2.1.7.2 Metode propagasi pada kultur sel

Vaksin Influenza A H5N1 dapat juga dikembangkan dengan metode propagasi pada kultur sel. Metode kultur sel untuk pembuatan kandidat vaksin merupakan alternatif lain disamping metode telur berembrio. Oleh karena virus galur H5 bersifat sangat patogenik dan menyebabkan kematian pada ayam, maka pengadaan sejumlah besar telur berembrio untuk pembuatan vaksin akan sulit disiapkan pada saat terjadi pandemik. Disamping itu, komponen pada telur dapat berpotensi menimbulkan reaksi alergi pada individu tertentu.<sup>21</sup> Beberapa jenis

kultur sel yang dapat digunakan sebagai sel substrat untuk produksi kandidat vaksin Influenza, antara lain: sel *Spodoptera frugiperda* (SF9), sel MDCK<sup>17, 44</sup> sel COS-1<sup>42</sup>; dan sel 293T (*human embryonic kidney*).<sup>43, 44</sup>

#### a) Vaksin Virus yang diinaktivasi

Melalui perkembangan produksi vaksin Influenza A H5N1, telah dilakukan uji klinik menggunakan vaksin *whole-virus* H5N1 monovalen galur A/Vietnam /1203 /2004, yang diproduksi dari kultur sel Vero. Vaksin diinaktivasi dengan menggunakan formalin dan sinar ultra violet. Berdasarkan hasil uji klinik fase I dan II dibuktikan bahwa, vaksin mampu menghasilkan antibodi netralisasi melawan virus galur (A/Vietnam/1203/2004) *clade 1* dan juga virus galur A/Indonesia/05/2005 *clade 2* dan A/Hong Kong/156/1997 *clade 3*.<sup>44</sup>

Pada saat ini, di Netherland telah dikeluarkan lisensi jenis vaksin Influenza yang diinaktivasi (*inactivated influenza vaccines*) yang diproduksi dengan metode kultur sel *madine-darbin canine kidney* (MDCK) dan sel Vero sebagai sel substrat.

Beberapa hal yang perlu diperhatikan pada proses produksi kandidat vaksin menggunakan metode kultur sel, yaitu seleksi pertumbuhan virus yang baik pada sel, monitoring untuk melihat perubahan antigenik dan monitoring mikroba kontaminan selama propagasi virus di dalam kultur sel.<sup>21</sup>

#### c) Vaksin VLP

Vaksin VLP menjadi pilihan untuk produksi kandidat vaksin Influenza A H5N1, karena VLP tidak mengandung materi genetik sehingga tidak bersifat infeksius dan onkogenik.<sup>7</sup> Keuntungan lainnya, yaitu karena vaksin VLP dapat ~~dipropagasi pada kultur sel, maka propagasi VLP dapat terus dihasilkan dengan~~ cepat dan aman pada saat terjadi pandemik, dan tidak memerlukan fasilitas BSL 3 untuk menjalankan proses produksi. Sebaliknya, teknologi telur berembrio untuk produksi kandidat vaksin sangat tergantung pada penyediaan telur, yang sulit pengadaanya pada saat terjadi krisis pandemik. Selain itu, oleh karena virus Influenza H5N1 sangat virulen, maka proses produksi kandidat vaksin Influenza A H5N1 memerlukan fasilitas BSL3.<sup>17</sup>

Penelitian mengenai vaksin VLP Influenza A, seperti yang ditulis oleh Quan Fu-Shi menyebutkan bahwa imunisasi mencit BalbC dengan kandidat vaksin VLP

subtipe H3N2, H9N2 mengurangi replikasi virus dan memberikan perlindungan melawan virusantang. Namun, respon imun yang dihasilkan oleh vaksin VLP Influenza belum dapat dikarakterisasi dan diketahui adanya kekebalan proteksi silang.<sup>17</sup> Penelitian Quan pada tahun 2007, menyebutkan imunisasi kandidat vaksin VLP Influenza A/PR8 (H1N1) pada mencit secara intranasal menghasilkan respon imun mukosal dan sistemik, termasuk komponen imun selular dan humoral, serta memberikan proteksi silang melawan virusantang dari subtipe yang homolog maupun heterolog.<sup>17</sup> Szécsi *et al* pada tahun 2006 membuat VLP (flu-VLP) virus H7N1 dan H5N1 yang diperoleh dari partikel inti retrovirus (*Murine leukemia virus*) yang mengandung protein HA, HA-NA dan HA-M2, HA-NA-M2. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa flu-VLP dapat menghasilkan antibodi netralisasi titer tinggi pada mencit dalam waktu 2 minggu paska imunisasi.<sup>43</sup>

## 2.2 Sistem Ekspresi Mamalia

Sistem ekspresi pada mamalia memiliki peran yang penting dalam bidang penelitian maupun untuk menghasilkan produk komersil. Aplikasi penggunaan sistem ekspresi mamalia dapat berupa produk terapeutik, pustaka komponen kimia untuk pengembangan *drug delivery* dan pengembangan biosensor. Produk terapeutik yang dihasilkan menggunakan sistem ekspresi pada sel mamalia, misalnya protein untuk terapi manusia, vaksin dan produk diagnostik. Bentuk lain penggunaan sel mamalia untuk ekspresi gen adalah pengklonaan gen dan karakteristik protein secara biokimia atau biofisika.<sup>48</sup>

Sistem ekspresi pada sel mamalia merupakan salah satu alternatif yang dipilih untuk mengekspresikan protein yang memerlukan proses modifikasi paska translasi. Virus menggunakan sel mamalia untuk proses modifikasi protein pada permukaan sel, yang mempengaruhi peran glikoprotein virus terhadap stabilitas, antigenisitas dan invasi sel hospes. Modifikasi protein dapat memberikan perubahan dalam siklus hidup virus. Telah diketahui ada dua perubahan dalam siklus hidup virus, yaitu: pertama adalah glikosilasi N pada protein envelop atau protein permukaan dapat meningkatkan pelipatan protein yang sesuai dan diikuti perubahan dengan menggunakan *chaperon* selular sel hospes dan faktor-faktor

pelipatan. Perubahan pada satu sisi atau pada tempat glikosilasi dapat memberikan dampak yang besar terhadap ketahanan hidup dan transmisi virus. Kedua adalah perubahan glikosilasi dapat mempengaruhi interaksi virus dengan reseptor, sehingga virus dapat dengan mudah dikenali oleh faktor imun alami sel hospes dan kurang dikenali oleh antibodi, sehingga mempengaruhi replikasi dan infektivitas virus.<sup>16</sup> Sistem ekspresi lain yang sering digunakan adalah sistem ekspresi pada sel serangga. Pada sistem ini, telah diketahui sel serangga dapat mengekspresikan protein yang mengalami modifikasi paska translasi melalui proses glikosilasi N. Glikosilasi N pada sel serangga mempunyai kelemahan, yaitu glikosilasi N dapat terjadi secara sempurna atau tidak terjadi sama sekali. Selain itu, berdasarkan analisis struktur karbohidrat ditemukan jumlah glikoprotein terbatas.<sup>41</sup> Pushko, 2005 menyebutkan bahwa sistem ekspresi pada sel serangga dan perbedaan modifikasi paska translasi, seperti glikosilasi kemungkinan dapat memberikan pengaruh negatif terhadap imunogenisitas.<sup>49</sup> Dengan demikian, sistem ekspresi protein pada sel mamalia melalui proses glikosilasi diharapkan dapat menghasilkan protein dalam skala besar.

### 2.2.1 *Internal Ribosome Entry Site (IRES)*

Sebagian besar mRNA sel eukariot berfungsi monosistronik dan mengandung struktur tudung m<sup>7</sup>GpppN pada ujung 5', dimana N dapat berupa salah satu nukleotida. Mekanisme translasi protein menggunakan mRNA monosistronik dengan struktur tudung pada ujung 5' hanya menghasilkan satu macam protein.<sup>32</sup>

Proses translasi ini terjadi melalui mekanisme ribosom *scanning*, dimana subunit ribosom 40S berikatan dengan mRNA pada struktur tudung pada ujung 5' dan melibatkan sejumlah faktor inisiasi, kemudian melakukan *scanning* dari ujung 5' sampai ujung 3', hingga menemukan kodon inisiasi yang sesuai.<sup>28</sup> Namun demikian, untuk kelangsungan hidup sel mRNA dapat menggunakan bentuk alternatif inisiasi translasi yang berbeda dengan mekanisme translasi standar, yaitu tidak memerlukan nukleotida bertudung sebagai faktor inisiasi. Alternatif mekanisme inisiasi translasi yang digunakan, yaitu melalui IRES.<sup>29,31,32,33</sup> *Internal ribosome entry site* merupakan sekuen yang berperan untuk mendukung proses inisiasi translasi dengan membawa ribosom secara langsung masuk ke dalam situs

kodon inisiasi AUG tanpa melalui *scanning* struktur tudung pada ujung 5'. Selain itu, IRES dapat berperan untuk pembentukan mRNA bisistronik yang dapat melakukan translasi 2 macam protein yang berbeda.<sup>28</sup> Penelitian yang telah dilakukan pada beberapa virus menunjukkan bahwa mekanisme translasi mRNA melalui sistem IRES terjadi bila struktur tudung dihambat karena kondisi, seperti iradiasi sinar UV, *heat shock* yang terus menerus, fase G<sub>2</sub>/M pada siklus sel, dan apoptosis.<sup>34,35</sup>

Berdasarkan beberapa hasil penelitian telah diketahui adanya sekuen IRES selular pada beberapa organisme (manusia, tikus, mencit, khamir, ayam, lalat, tumbuhan) dan IRES viral pada beberapa famili virus, antara lain Retroviridae, Flaviviridae, Picornaviridae, Poxviridae; sedangkan fungsi IRES dapat berbeda tergantung pada jenis organisme dan nama gen dimana sekuen IRES ditemukan.<sup>33</sup> IRES selular dan IRES virus mempunyai elemen IRES yang mirip, demikian juga sistem translasi mekanisme IRES.<sup>34</sup>

Pada penelitian ini digunakan 2 jenis IRES, yaitu IRES HIV dan IRES MLV dan kedua jenis virus ini termasuk dalam famili Retroviridae. Retrovirus mempunyai tiga macam *reading frame* utama, yaitu *gal*, *pol* dan *env*, yang digunakan untuk sintesis protein struktural, enzim dan protein selubung (*envelope*).<sup>38</sup>

#### 2.2.1.1 IRES Human Immunodeficiency Virus TIPE I (IRES HIV)

Karakteristik sebagian besar IRES virus dan IRES selular berada pada daerah hulu *open reading frame* (ORF), yang sejalan dengan mekanisme *scanning* yang dimulai dari ujung 5' ke 3'. Namun ada pengecualian, yaitu pada HIV tipe 1, IRES ditemukan di dalam ORF *gag*, yang membawa inisiasi translasi pada hulu kodon inisiasi *gag*.<sup>28</sup> Berdasarkan data pada penelitian ini, menjelaskan bahwa mRNA yang mengandung ORF *gag* pada HIV-1 memperlihatkan aktifitas IRES, yang menghasilkan protein prekursor *gag* (Pr55<sup>gag</sup>) dan *novel gag isoform* (p40) dengan ukuran 40 kDA yang dipotong pada daerah terminal N.<sup>31</sup> Selain itu, diketahui juga bahwa *novel gag isoform* ditemukan pada sel kultur yang diinfeksi oleh HIV tipe-1.<sup>31</sup> Pengamatan aktifitas IRES pada beberapa spesies retrovirus menunjukkan bahwa aktifitas tersebut mungkin merupakan aspek penting dari

sifat biologi retrovirus.<sup>31</sup> Berdasarkan penelitian Brasey et al pada tahun 2003, sekuen IRES HIV terdapat pada posisi nukleotida 104-336, terdiri dari *primer binding site* (PBS), *dimer initiation site* (DIS), *the major splice donor* (SD), *the core packaging signal* ( $\Psi$ ) dan *hairpin* yang mengandung kodon inisiasi AUG.<sup>28</sup>

### 2.2.1.2 IRES Murine Leukemia Virus (IRES MLV)

Genom RNA Retrovirus merupakan pembawa translasi gen *gag* yang mengkode prekursor protein struktural utama dan gen *pol* mengkode prekursor enzim pada inti virion. Namun demikian, genom RNA MLV diketahui dapat langsung melakukan sintesis dua protein yang berkaitan dengan protein *gag*. Protein tersebut adalah Pr65<sup>gag</sup> yang merupakan prekursor protein struktural pada inti virion, dan Pr75<sup>glyco-gag</sup> sebagai prekursor protein *gag* glikosilasi (gliko-*gag*) yang ditemukan pada permukaan sel yang diinfeksi MLV. Prekursor gliko-*gag* diinisiasi oleh kodon CUG pada daerah hulu dan merupakan ORF yang sama seperti AUG<sup>gag</sup>.<sup>29</sup> Pada *Friend-Murine Leukemia virus* (F-MLV), proses translasi Pr65<sup>gag</sup> dimulai dengan kodon inisiasi AUG pada posisi 619, sedangkan proses translasi Pr75<sup>glyco-gag</sup> diawali dengan kodon inisiasi CUG pada posisi 355, yang ditemukan pada 5' *untranslated region* (*leader*) dan *in frame* dengan AUG<sup>gag</sup>.<sup>29</sup> Untuk mencegah pembentukan protein gliko-*gag* oleh kodon inisiasi CUG pada posisi 355, maka dilakukan mutasi pada CUG. Mutasi pada kodon inisiasi gliko-*gag* (CUG 355) tidak mempengaruhi ekspresi protein *gag* yang dibentuk oleh kodon inisiasi *gag* (AUG 355).<sup>29</sup> Karakteristik *leader* secara fungsional dan identifikasi dua kodon inisiasi di dalam ORF yang sama pada 5' *leader* RNA MLV merupakan dua gambaran yang diduga dapat menghambat proses *scanning* ribosom untuk mencapai situs inisiasi yang benar.<sup>29</sup>

Penelitian oleh Deffaud dan Darlix pada tahun 2000, memperlihatkan bahwa pada 5' *untranslated region* atau disebut *leader* genom *env* RNA MLV mengandung IRES yang dapat menghasilkan sintesis protein *gag* dan prekursor poliprotein gliko-*gag*. Penelitian ini telah membuktikan bahwa penghilangan sepanjang 280 nukleotida pertama pada daerah 5' *leader env* RNA MLV menyebabkan penurunan aktivitas IRES. Hal ini menunjukkan bahwa daerah 5' *leader* mempunyai peran penting dalam mekanisme masuknya ribosom.<sup>30</sup> Selain



itu juga, pada RNA MLV (*full-length RNA*) diketahui bahwa sekuen IRES MLV berada setelah sekuen *splicing donor* (SD) pada posisi 204 genom RNA.<sup>30</sup>

### 2.2.2 Pengklonaan

Pengklonaan gen merupakan salah satu teknik rekombinan DNA atau *genetic engineering* yang menyisipkan gen ke dalam suatu vektor yang berupa DNA sirkuler dan apabila diinokulasi ke dalam sel hospes yang sesuai dapat menghasilkan sejumlah salinan molekul DNA rekombinan yang identik.<sup>14</sup> Pada proses pengklonaan melibatkan penggabungan atau ligasi asam deoksiribonukleat (DNA) dengan vektor, dimana bentuk konstruksi hasil ligasi dimasukkan ke dalam sel hospes yang sesuai. Pada saat pembelahan sel, DNA sel induk bereplikasi dan menghasilkan sel-sel anak yang identik. Proses regenerasi yang terus menerus menghasilkan populasi sel yang mengandung klon DNA yang identik dengan induknya.<sup>14, 26</sup>

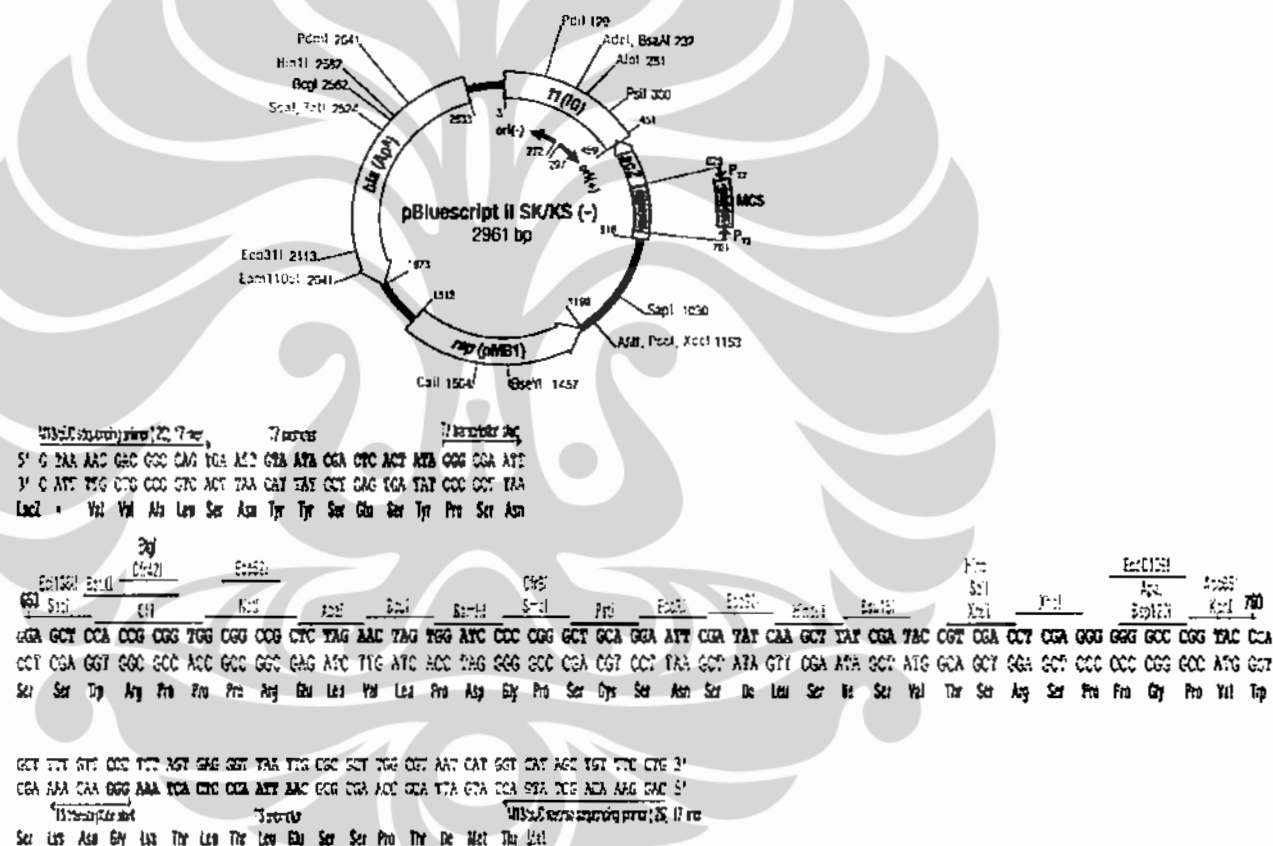
Beberapa faktor yang berpengaruh pada proses pengklonaan gen, antara lain alat pembawa gen (*vehicles*), teknik penanganan DNA dan keragaman vektor pengklonaan.<sup>14</sup> Teknik penanganan DNA dalam proses pengklonaan meliputi purifikasi DNA dari sel dan penanganan DNA murni. Fragmen DNA maupun vektor yang digunakan untuk menghasilkan plasmid rekombinan dipotong pada situs restriksi yang spesifik dan kemudian digabungkan kembali sesuai tujuan pengklonaan. Proses pemotongan vektor ataupun DNA murni memerlukan enzim restriksi endonuklease, sedangkan proses penggabungan menggunakan enzim ligasi.<sup>14</sup> Fungsi vektor pada proses pengklonaan, yaitu sebagai alat pembawa gen masuk ke dalam sel hospes dan bertanggung jawab pada proses replikasi. Salah satu tipe vektor yang digunakan untuk pengklonaan adalah plasmid. Plasmid merupakan DNA berbentuk lingkaran kecil yang ditemukan di dalam bakteri dan beberapa organisme lain. Plasmid dapat bereplikasi secara independen di dalam kromosom sel hospes.<sup>14</sup>

#### 2.2.2.1 Plasmid pBluescript KS (-)

Plasmid pBluescript II KS (-) mempunyai ukuran panjang 2961 pb, yang didesain untuk pengklonaan DNA. Plasmid pBluescript KS (-) memiliki orientasi



MCS yang mengandung gen lacZ pengkode fragmen β-galaktosidase pada ujung N, dimana transkripsi lacZ dimulai dari SacI menuju KpnI. Plasmid pBluescript II KS (-) mengandung fl (IG): regio intergenik faga fl; rep (pMB1): replikon pMB1 yang berperan untuk replikasi fagamid; gen bla (ApR): pengkode beta-laktamase yang resisten terhadap ampisilin. Nukleotide 2833-2765 (untai komplementer) merupakan kode untuk sinyal peptida; dan lacZ : gen lacZ pada ujung 5' pengkode fragmen ujung N beta-galaktosidase. Fragmen gen lacZ digunakan untuk seleksi biru putih plasmid rekombinan pada proses pengklonan DNA (gambar 2.4).<sup>25</sup>

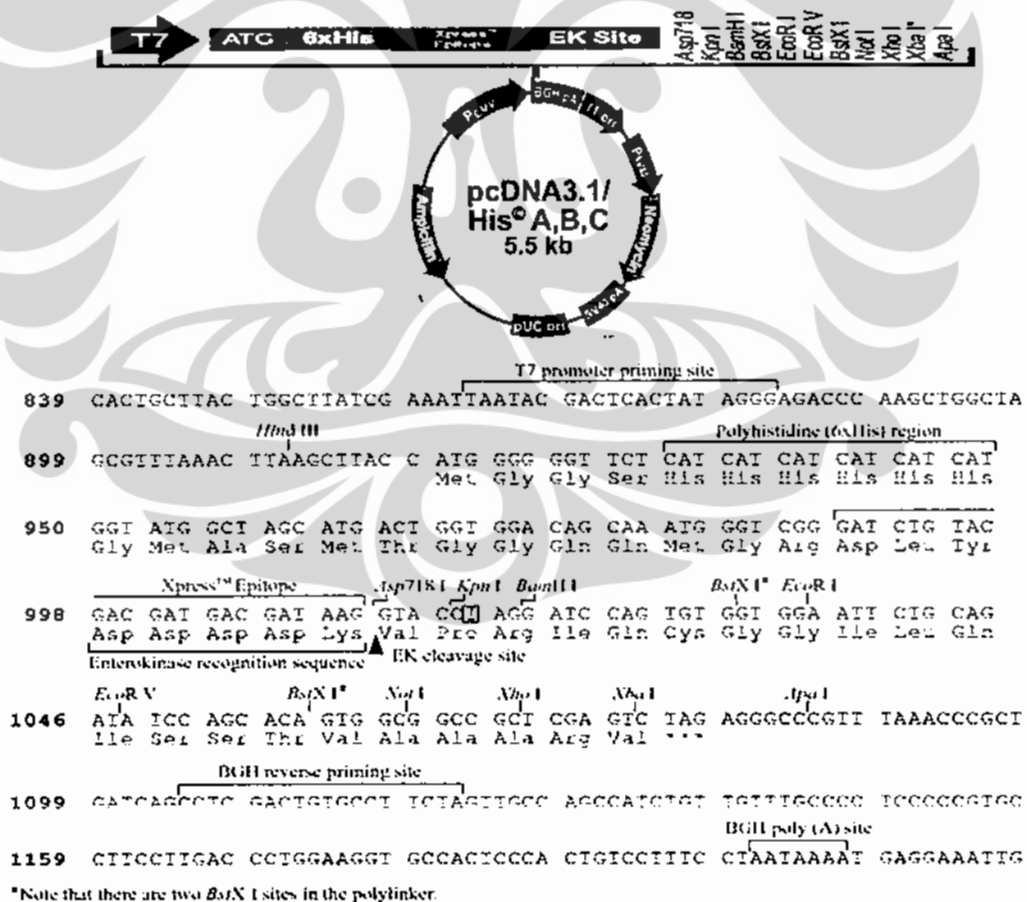


Gambar 2.4. Peta dan situs restriksi plasmid pBluescript II KS (-) Fermentas, 2008.

2.2.2.2 Plasmid pcDNA3.1/His A

Plasmid pCDNA3.1/His A merupakan vektor yang mempunyai ukuran 5514 pasangan basa (pb) berasal dari pcDNA3.1 dan didesain untuk sistem ekspresi gen atau fragmen gen dengan tingkat kestabilan tinggi pada sel mamalia. Selain itu, protein rekombinan yang dihasilkan dari proses translasi pada sel mamalia dapat

langsung dipurifikasi. Plasmid pCDNA3.1/His A dilengkapi tiga *reading frame* untuk tempat pengklonan yang membawa sebuah *polyhistidine metal-binding tag*. Polihistidin (6xHis) berfungsi dalam proses purifikasi protein rekombinan, yang mempunyai afinitas pengikatan tinggi dengan menggunakan *kolom metal chelating resin*. Plasmid mengandung 2 promotor, yaitu *human cytomegalovirus* (CMV) untuk ekspresi tingkat tinggi protein rekombinan pada sel mamalia dan *Simian virus 40* (SV40) *early promoter and origin* diperlukan untuk replikasi episom dalam sel-sel yang mengekspresikan SV40 large T antigen. Plasmid mengandung promotor T7 untuk transkripsi secara *in vitro* dan sinyal poliadenilasi *bovine growth hormon* (BGH) serta sinyal poliadenilasi awal SV40 yang berperan untuk mengatur efisiensi terminasi translasi. Gen resisten ampisilin digunakan untuk seleksi vektor di dalam *Escherichia coli*, sedangkan gen resisten neomisin untuk seleksi transfektan stabil di dalam sel mamalia<sup>13</sup> (gambar 2.5).



Gambar 2.5. Peta dan situs restriksi plasmid pcDNA3.1/His A

Invitrogen, 2001.

## BAB 3

### BAHAN DAN CARA KERJA

#### 3.1 Lokasi dan waktu penelitian

Penelitian dilakukan di *Laboratorium Institute of Human Virology and Cancer Biology University of Indonesia (IHVCB-UI)*, Gedung IASTH lantai 8, Jalan Salemba 4, Jakarta Pusat 10430, selama sebelas bulan (April 2008 – Pebruari 2009).

#### 3.2 Bahan

##### 3.2.1 Fragmen DNA hemagglutinin (HA) dan neuraminidase (NA) virus Influenza A H5N1

Fragmen HA dan NA yang digunakan adalah virus Influenza A H5N1 isolat dari ayam (donasi dari salah satu peternakan di Indonesia). Galur virus Influenza A H5N1 belum dikarakterisasi dan belum terdaftar, sehingga penamaan galur ini hanya untuk kepentingan penelitian tesis, yaitu A/chicken/Indonesia/Jpf-001/07 (H5N1). Fragmen HA diisolasi dari klon *pcDNA5/FRT* yang mengandung DNA sisipan HA (*pcDNA5/FRT-HAsc#10*) dan fragmen NA diisolasi dari klon *pcDNA3.1/His A* yang mengandung gen NA (*pcDNA3.1/His A-NA#2*). Klon tersebut diperoleh dari hasil penelitian di *Laboratorium IHVCB-UI*.

##### 3.2.2 Plasmid rekombinan *pKS-IRESHIV* dan *pKS-IRESMLV*

Fragmen DNA *Human Immunodeficiency Virus Internal Ribosomal Sites (IRES HIV)* dan *blocking sequence fragment (BSF)* diperoleh dengan teknik *polymerase chain reaction (PCR)* dan menggunakan plasmid *pNL 43* (diperoleh dari *Laboratorium Institute Pasteur Paris*) sebagai cetakan DNA (*deoxyribonucleic acid*). Fragmen *Murine Leukemia Virus Internal Ribosomal Sites (IRES MLV)* diperoleh dengan teknik PCR dan menggunakan plasmid *pAMS* (koleksi Departemen Mikrobiologi FKUI yang diperoleh dari *The Institute of Medical and Veterinary, Adelaide, South Australia*) sebagai cetakan DNA. Fragmen IRES HIV diklon ke dalam plasmid *pBluescript KS (-)* (Fermentas) sebagai klon *pKS-IRESHIV(2)* dan fragmen IRES MLV diklon

ke dalam plasmid pBluescript KS (-) sebagai klon pKS-IRESMLV(4). Amplikon fragmen BSF dipotong pada situs EcoRV dan dipurifikasi dari gel *low melting agarose* (LMA). Plasmid rekombinan pKS-IRES HIV, pKS-IRES MLV dan BSF-EcoRV diperoleh dari hasil penelitian di Laboratorium IHVCB-UI.

### 3.2.3 Primer

Pasangan primer untuk pembuatan fragmen HA, NA, IRES HIV, IRES MLV dan BSF didesain oleh IHVCB-UI dengan menggunakan *software DNAsis*, HITACHI SOFTWARE ENGINEERING, 1991).

### 3.2.4 Vektor

Vektor plasmid yang digunakan pada penelitian ini adalah pBluescript KS (-) (Fermentas) dan pcDNA3.1/ His A (Invitrogen).<sup>13</sup> Plasmid rekombinan pKS-HIV(2) digunakan sebagai vektor untuk pengsubklonaaan fragmen BSF. Plasmid rekombinan pcDNA3.1/ His A yang mengandung fragmen NA (pcDNA3.1/His A-NA(2) digunakan sebagai vektor *backbone* untuk subklona fragmen HA, IRES HIV-BSF dan IRES MLV. Selain itu, plasmid pcDNA3.1/ His A juga digunakan sebagai vektor pengekspreasi fragmen IRES MLV-NA-IRES HIV-HA.

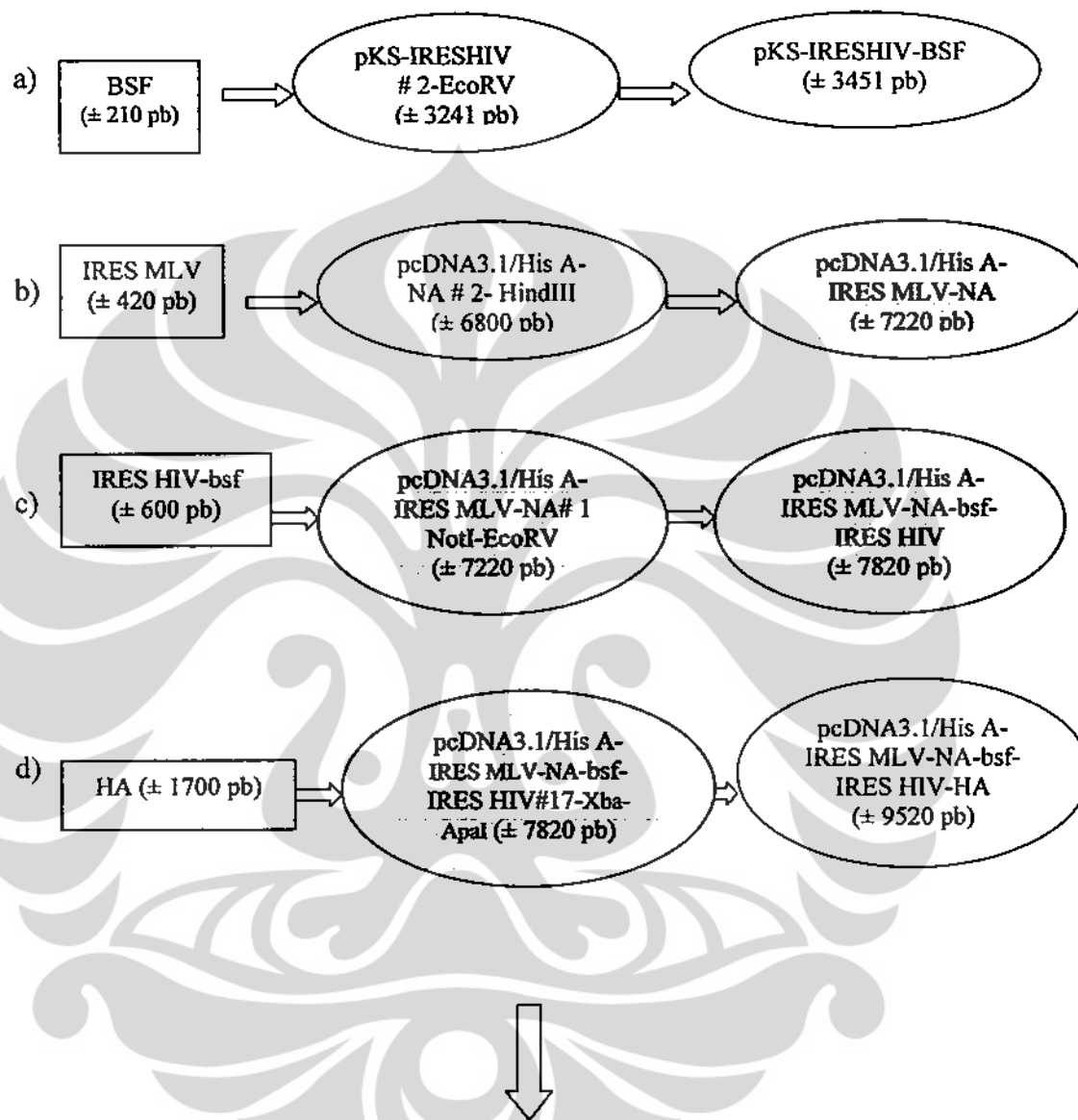
### 3.2.5 Galur bakteri

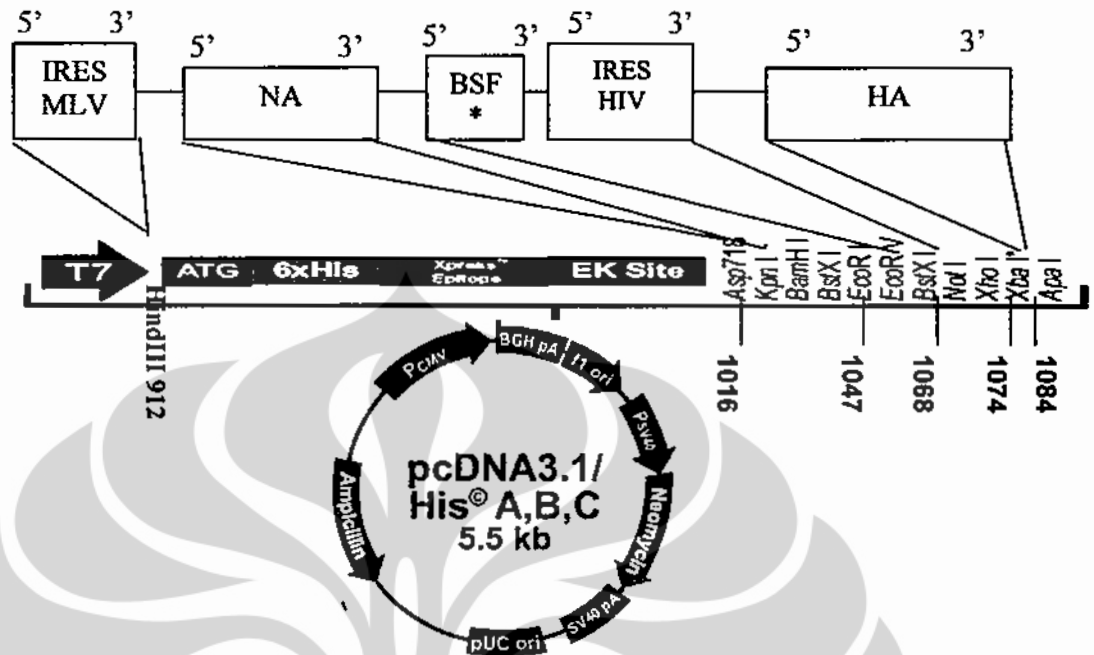
Bakteri yang digunakan untuk perbanyakkan plasmid pada penelitian ini adalah *Escherichia coli* galur TOP 10. Bakteri tersebut digunakan karena mempunyai sifat efisiensi transformasi yang tinggi. Media yang digunakan untuk pertumbuhan bakteri *E. coli* TOP 10 adalah media *Luria Bertani* (LB) agar dan cair. Media LB agar mengandung ampisilin dengan konsentrasi 50 µg/mL, sedangkan media LB cair mengandung ampisilin dengan konsentrasi 100 µg/mL. Bakteri *E. coli* TOP 10 dibiakkan di dalam inkubator pada suhu 37°C.

## 3.3 Cara kerja

Persiapan fragmen DNA sisipan IRES HIV, IRES MLV dan BSF dilakukan dengan cara pemotongan plasmid dengan enzim restriksi endonuklease. Tahap selanjutnya, yaitu pengklonaaan tandem IRES MLV-NA-IRES HIV-HA pada

vektor pengeksresi pcDNA3.1/His A yang dilakukan dengan beberapa pengsubklonaaan sebagai berikut:





Gambar 3.1. Alur tahap pengsubklonasi fragmen BSF, IRES MLV, IRES HIV, HA ke dalam vektor pcDNA3.1/His A, B, C. Tanda \*: fragmen BSF arah orientasi terbalik

### 3.3.1 Pengsubklonasi BSF ke dalam plasmid rekombinan pKS IRES HIV# 2 pada situs restriksi EcoRV

#### 3.3.1.1 Pemotongan plasmid rekombinan pKS IRES HIV# 2

Plasmid rekombinan pKS-IRES HIV #2 mengandung fragmen IRES HIV dengan orientasi terbalik, dengan situs restriksi NheI pada ujung 3' dan SacII pada ujung 5'. Pemastian arah orientasi fragmen IRES HIV pada pKS-IRES HIV# 2 dilakukan dengan memotong plasmid rekombinan dengan enzim restriksi endonuklease HindIII dan NheI, yang akan menghasilkan fragmen IRES HIV ( $\pm$  260 pb). Pemastian arah orientasi terbalik juga dilakukan dengan menggunakan enzim restriksi endonuklease SacII yang memotong situs restriksi SacII pada vektor dan situs restriksi pada ujung 5' fragmen IRES HIV, sehingga menghasilkan fragmen IRES HIV ( $\pm$  280 pb). Reaksi pemotongan menggunakan

enzim HindIII (Research Biolabs) dilakukan dengan campuran reaksi 10 x BSA, 10 x dapar NE 2 (50mM *sodium chloride*, 10 mM *tris-chloride acide*, 10mM *magnesium chloride*, 1 mM *dithithreitol*) dan air demineralisata (Sigma). Campuran reaksi pemotongan diinkubasi pada suhu 37°C selama satu malam. Sebelum dilanjutkan dengan pemotongan menggunakan enzim NheI, plasmid pKS-IRESHIV# 2- HindIII dipurifikasi dengan metode kolom (QIAEX II, Qiagen).<sup>15</sup> Reaksi pemotongan menggunakan enzim NheI (Research Biolabs) dilakukan dengan campuran reaksi 10 x BSA, 10 x dapar NE 2 (50 mM *sodium chloride*, 10 mM *tris-chloride acide*, 10 mM *magnesium chloride*, 1 mM *dithithreitol*) dan air demineralisata (Sigma). Campuran reaksi pemotongan diinkubasi pada suhu 37°C selama satu malam. Pengsubklonaan BSF (210 pb) pada plasmid rekombinan pKS IRESHIV# 2 dilakukan pemotongan plasmid rekombinan dengan enzim restriksi EcoRV. Reaksi pemotongan dilakukan dengan campuran reaksi 10 x BSA, 10 x dapar NE 3 (100 mM *sodium chloride*, 50 mM *tris-chloride acide*, 10 mM *magnesium chloride*, 1 mM *dithiothreitol*), enzim EcoRV (Research Biolabs) dan air demineralisata (Sigma). Campuran reaksi pemotongan diinkubasi pada suhu 37°C selama satu malam. Setiap tahap pemastian hasil pemotongan plasmid pKS-IRES HIV# 2 dengan restriksi endonuklease HindIII-NheI ataupun SacII dianalisis dengan menggunakan elektroforesis gel agarosa 0,8 %.

### 3.3.1.2 Purifikasi hasil pemotongan

Hasil pemotongan pKS-IRESHIV#2-EcoRV dipurifikasi dengan metode kolom menggunakan *QIAquick colomn* sesuai prosedur dari QIAEX II, Qiagen.<sup>15</sup> Sebelum fragmen BSF diligasi dengan plasmid rekombinan pKS-IRES HIV# 2 pada situs EcoRV, kedua ujung produk BSF dibuat menjadi berujung tumpul (*blunt*) dengan metode *blunt end polish* melalui teknik PCR dengan enzim *platinum pfx DNA polimerase*. Selanjutnya, fragmen BSF *blunt* dipurifikasi dengan metode QIAEX II, Qiagen.<sup>15</sup> Pemastian hasil pemotongan dengan enzim restriksi dan hasil produk *blunt end polish* dilakukan menggunakan elektroforesis dengan gel poliakrilamid 10%.

### 3.3.1.3 Ligasi DNA sisipan ke dalam vektor

Fragmen BSF-EcoRV-*blunt* diligasi dengan vektor pKS-IRES HIV-EcoRV dengan perbandingan DNA sisipan dengan vektor adalah 3 : 1. Reaksi ligasi dilakukan dengan campuran 10 x *T4 DNA ligase buffer*, enzim *T4 DNA ligase*, dan air demineralisata (Sigma). Untuk kontrol negatif ligasi disiapkan sesuai dengan cara sama, namun tidak mengandung DNA sisipan. Campuran reaksi ligasi kemudian diinkubasi pada suhu 16°C selama 16 jam. Prosedur ligasi sesuai dengan petunjuk dari Sambrook, *et al.*<sup>37</sup> Selanjutnya, hasil ligasi ditransformasi pada sel hospes *E. coli* TOP 10 yang telah dibuat menjadi sel kompeten pada suhu dingin.

### 3.3.1.4 Transformasi hasil ligasi

Hasil ligasi kemudian ditransformasi ke dalam sel hospes bakteri *E. coli* TOP 10 untuk memperbanyak plasmid rekombinan. Prosedur transformasi sesuai dengan petunjuk dari Sambrook, *et al.*<sup>37</sup> Transformasi dilakukan dengan metode *heat shock* CaCl<sub>2</sub>. Pada prosedur ini dilakukan penambahan larutan MgCl<sub>2</sub> dan CaCl<sub>2</sub> dingin serta perlakuan dengan *heat shock* pada suhu 38°C terhadap *E. coli* TOP 10.

Pembuatan sel kompeten dengan cara menumbuhkan *E. coli* TOP 10 pada medium *Luria Bertani* (LB) pada suhu 37°C selama 2 jam atau hingga pertumbuhan bakteri mencapai *fase log*. Setelah itu, sel *E. coli* TOP 10 diinkubasi pada suhu dingin (pada wadah berisi es) selama 15 menit. Sel dipanen dengan cara sentrifugasi pada kecepatan 3.500 rpm pada suhu 4°C selama 10 menit. Setelah supernatan dibuang, pada pelet sel ditambahkan 1/5 volume total medium LB sebelumnya, larutan 0,1 M MgCl<sub>2</sub> dingin, pelet diresuspensi secara perlahan, dan diinkubasi pada suhu dingin selama 20 menit. Disentrifugasi kembali pada kecepatan 3.500 rpm pada suhu 4°C selama 10 menit. Kemudian supernatan dibuang, larutan 0,1 M CaCl<sub>2</sub> dingin sejumlah 1/50 volume total medium LB sebelumnya, ditambahkan pada pelet sel, dilakukan resuspensi sel secara perlahan, dan diinkubasi pada suhu dingin selama 1 jam. Setelah 1 jam inkubasi, suspensi pelet disentrifugasi pada kecepatan 3.500 rpm pada suhu 4°C selama 10 menit. Supernatan dibuang, kemudian pelet dilarutkan dengan 0,1 M CaCl<sub>2</sub> dingin



dengan volume sesuai dengan kebutuhan dan dilakukan resuspensi secara perlahan.

Proses transformasi dilakukan dengan memasukkan hasil ligasi ke dalam sel kompeten pada suhu dingin. Kemudian sel transforman diinkubasi pada suhu dingin selama 1 jam. Setelah itu, dilakukan *heat shock* pada suhu 38°C selama 90 detik, dan sel transforman secara cepat dipindahkan ke dalam es dan didiamkan selama 60 detik. Sel transforman dikeluarkan dari es dan ditambahkan medium SOC sebanyak 2 x volume suspensi, kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 1 jam yang diletakkan di atas *shaker*. Setelah inkubasi, sel transforman ditanam pada media LB agar mengandung ampisilin dengan konsentrasi 50 µg/mL. Setelah hasil transformasi diinkubasi pada suhu 37°C selama 16 jam akan terlihat pertumbuhan *E. coli*. Koloni putih yang tumbuh pada media LB agar yang mengandung ampisilin 50 µg/mL adalah plasmid rekombinan yang terdapat DNA sisipan fragmen BSF. Untuk identifikasi, klon yang tumbuh dipilih secara acak, dibuat replika klon pada media LB agar mengandung ampisilin 50 µg/mL dan dinokulasi ke dalam media LB cair yang mengandung ampisilin 100 µg/mL, kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 16 jam. Setelah diinkubasi, klon yang diperbanyak di dalam media LB cair diisolasi sesuai dengan prosedur isolasi dari *QIAprep Mini spin* (Qiagen).<sup>15</sup>

#### 3.3.1.5 Isolasi plasmid rekombinan pKS-IRES-BSF

Plasmid rekombinan pKS-IRES HIV-BSF diisolasi dari bakteri *E. coli* TOP 10 menggunakan metode ekstrasi *QIAprep Mini spin* (Qiagen).<sup>15</sup>

Bakteri *E. coli* yang membawa plasmid rekombinan ditumbuhkan dalam medium LB cair yang mengandung ampisilin 100 µg/mL pada suhu 37°C selama 16 jam. Pada waktu ini bakteri mencapai puncak pertumbuhan fase log. Setelah itu, bakteri dipindahkan ke dalam tabung *Eppendorf* dan disentrifugasi dengan kecepatan 12.000 rpm pada suhu ruang selama 1 menit. Supernatans yang terbentuk dibuang, dan ditambahkan larutan P1 (Qiagen) pada pelet, kemudian diresuspensi dengan larutan ini. Setelah itu larutan P2 (Qiagen) ditambahkan ke dalam suspensi dan dilakukan pembolak-balikan tabung sebanyak 7 kali, selanjutnya ditambahkan larutan N3 (Qiagen), dan dilakukan kembali pembolak-

balikan sebanyak 7 kali. Kemudian suspensi pelet disentrifugasi pada kecepatan 12.000 rpm pada suhu ruang selama 10 menit.

Supernatan (lisat) yang terbentuk diambil dan dimasukkan ke dalam *QIAquick spin column* (kolom biru) yang terdapat filter DNA, kemudian disentrifugasi pada kecepatan 12.000 rpm pada suhu ruang selama 1 menit. Setelah itu, supernatan yang berada pada tabung penampungan dibagian bawah *QIAquick spin column* dipindahkan kembali pada *QIAquick spin column*, dan disentrifugasi pada kecepatan 12.000 rpm pada suhu ruang selama 1 menit. Supernatan diambil dan dimasukkan ke dalam tabung *Eppendorf* semula. *QIAquick spin column* yang mengandung DNA dicuci dengan dapar PB (Qiagen) supaya DNA terikat pada membran dan disentrifugasi pada kecepatan 12.000 rpm pada suhu ruang selama 1 menit. Larutan PB pada penampungan dibuang dan ditambahkan larutan PE (Qiagen) yang mengandung etanol, kemudian disentrifugasi pada kecepatan 12.000 rpm pada suhu ruang selama 1 menit. Larutan PE pada tabung penampungan dibuang dan disentrifugasi kembali pada kecepatan 12.000 rpm pada suhu ruang selama 1 menit untuk menghilangkan sisa etanol pada DNA plasmid rekombinan. Selanjutnya, kolom biru yang mengandung DNA dipindahkan ke dalam tabung *Eppendorf* steril, kemudian larutan dapar elusi (1/3 EB, Qiagen) dimasukkan tepat ditengah-tengah kolom biru, tidak menyentuh filter, didiamkan pada suhu ruang selama 1 menit dan disentrifugasi pada kecepatan 12.000 rpm pada suhu ruang selama 1 menit. Untuk meningkatkan konsentrasi DNA, dilakukan kembali penambahan 1/3 EB dengan cara yang sama.

~~Hasil isolasi plasmid rekombinan dianalisis menggunakan elektroforesis gel agarosa 0,8%. Berdasarkan analisis ini dapat diketahui adanya plasmid rekombinan dengan melihat perbedaan pola migrasi antara plasmid rekombinan pKS-IRES HIV#2-BSF dengan klon pKS-IRES HIV#2 yang berasal dari kontrol negatif ligasi.~~

### 3.3.1.6 Identifikasi klon pKS-IRES HIV-bsf

Identifikasi klon dilakukan dengan teknik PCR dan enzim restriksi endonuklease.

**a) Identifikasi dengan enzim restriksi**

Pada proses identifikasi klon dengan enzim restriksi, klon pKS-IRES HIV-bsf dan klon yang berasal dari kontrol negatif ligasi dipotong dengan enzim restriksi BamHI, sedangkan plasmid pKS-IRES HIV yang tidak dipotong enzim restriksi BamHI digunakan sebagai kontrol negatif. Jika hasil pemotongan klon dengan enzim BamHI menghasilkan plasmid linier, yaitu berupa pita DNA tunggal dengan panjang basa pKS-IRES HIV-bsf ( $\pm 3451$  pb), maka klon mengandung plasmid rekombinan dengan DNA sisipan BSF. Sebaliknya, kontrol negatif ligasi memperlihatkan pita DNA tunggal dengan panjang ukuran sesuai ukuran plasmid rekombinan pKS-IRES HIV, yaitu lebih kurang 3241 pb.

**b) Identifikasi dengan teknik PCR**

Identifikasi klon pKS-IRES HIV-bsf melalui teknik PCR menggunakan enzim *Hotstar Taq DNA polymerase* digunakan pasangan primer HIVR dengan BSF *reverse* (BSFR) dan pasangan BSF *forward* (BSFF) dengan primer M13R. Pada penelitian ini, primer BSFR yang digunakan sama dengan primer HIVR. Klon yang diduga mengandung DNA sisipan BSF (pKS-IRES HIV-bsf) digunakan sebagai cetakan DNA. Pada produk PCR yang dihasilkan dari pasangan primer HIVR dengan BSFR terbentuk pita DNA dengan panjang basa lebih kurang 500 pb dan dari pasangan BSFF dengan M13R memperlihatkan pita DNA tunggal dengan panjang basa lebih kurang 300 pb, maka klon mengandung sisipan BSF dengan arah orientasi benar, sesuai yang diperlukan. Sebagai kontrol positif digunakan primer HIVR dan BSFR dan sebagai cetakan DNA digunakan pKS-IRES HIV#2, yang diharapkan menghasilkan fragmen pita DNA dengan panjang lebih kurang 280 pb. Kontrol negatif untuk primer dan air demineralisata digunakan pasangan primer HIVR dan BSFR serta pasangan primer M13R dan BSFF, tanpa mengandung cetakan DNA.

### 3.3.2 Pengsubklonaan IRES MLV ke dalam plasmid rekombinan pcDNA3.1/HisA-NA pada situs restriksi HindIII

#### 3.3.2.1 Persiapan fragmen DNA sisipan IRES MLV ( $\pm$ 420 pb)

Pada penelitian ini, fragmen IRES MLV dengan panjang lebih kurang 420 pb dihasilkan dari plasmid rekombinan pKS-IRES MLV # 4 yang dipotong dengan enzim restriksi endonuklease HindIII. Reaksi pemotongan dilakukan dengan campuran reaksi 10 x *Bovine Serum Albumin* (BSA), 10 x dapar NE 2 (50 mM *sodium chloride*, 10 mM *tris-chloride acide*, 10 mM *magnesium chloride*, 1 mM *dithithreitol*), enzim HindIII (Research Biolabs) dan air demineralisata (Sigma). Campuran reaksi pemotongan diinkubasi pada suhu 37°C selama satu malam. Selanjutnya, plasmid rekombinan pKS-IRES MLV#4-HindIII dianalisis menggunakan elektroforesis gel LMA 1% mengandung ungu kristal 1,6 $\mu$ g/mL untuk pewarnaan DNA. Kemudian potongan gel fragmen IRESMLV-HindIII dipurifikasi dengan metode *Qiaex II purification kit* [Qiagen].<sup>15</sup> Fragmen IRES MLV-HindIII disebut QGIRES MLV-HindIII.

#### 3.3.2.2 Persiapan vektor *backbone* pcDNA3.1/HisA-NA(2)

Vektor *backbone* pcDNA3.1/HisA-NA(2) dipotong dengan enzim restriksi endonuklease HindIII dan diinkubasi pada suhu 37°C selama satu malam. Setelah itu, hasil pemotongan tersebut dipurifikasi dengan metode *Qiaex II*. Pemastian hasil pemotongan pcDNA3.1/HisA-NA(2)-HindIII (p) dianalisis dengan melakukan transformasi pada sel kompeten *E. coli* TOP 10, setelah itu dilanjutkan dengan inokulasi pada media LB agar mengandung 50  $\mu$ g/mL ampisilin. Plasmid telah dipotong sempurna oleh enzim restriksi HindIII, apabila jumlah koloni yang tumbuh pada media LB agar tidak lebih dari 20 koloni. Jika koloni yang tumbuh lebih dari 20 koloni, maka dilakukan kembali pemotongan dengan enzim restriksi HindIII, sampai diperoleh hasil transformasi dengan jumlah koloni tidak lebih dari 20 koloni. Kemudian plasmid pcDNA3.1/HisA-NA(2)-HindIII(p) yang sudah dipotong sempurna ditambah *calf intestinal phosphatase* (CIP) dan selanjutnya dianalisis menggunakan elektroforesis gel LMA 0,8% mengandung ungu kristal

1,6 µg/mL untuk pewarnaan DNA. Metode purifikasi gel agarosa sesuai dengan prosedur dari QIAEX II, Qiagen.<sup>15</sup>

### 3.3.2.3 Ligasi DNA sisipan ke dalam vektor

Hasil isolasi gel, sebagai vektor QGpcDNA3.1/HisA-NA(2)-HindIII(p) diligasi dengan fragmen QGIRES MLV-HindIII dengan perbandingan vektor dan DNA sisipan adalah 1:3. Untuk kontrol negatif ligasi disiapkan sesuai dengan cara sama, namun tidak mengandung DNA sisipan. Setelah proses ligasi pada suhu 16°C selama 16 jam, hasil ligasi ditransformasi pada sel hospes *E. coli* TOP 10 yang telah dibuat menjadi sel kompeten pada suhu dingin.

### 3.3.2.4 Transformasi hasil ligasi

Transformasi dilakukan dengan metode *heat shock* CaCl<sub>2</sub> (seperti yang telah dijelaskan sebelumnya pada halaman 29, subjudul 3.3.1.4). Koloni putih yang tumbuh pada media LB agar mengandung 50 µg/mL ampisilin adalah plasmid rekombinan yang berisi DNA sisipan IRES MLV. Klon yang tumbuh dipilih secara acak, dibuat replika pada media LB agar mengandung ampisilin 50 µg/mL dan diinokulasi ke dalam media LB cair yang mengandung ampisilin 100 µg/mL, kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 16 jam.

### 3.3.2.5 Isolasi plasmid rekombinan pcDNA3.1/HisA-IRES MLV-NA

Plasmid rekombinan pcDNA3.1/HisA-IRES MLV-NA diisolasi dari bakteri *E. coli* TOP 10 menggunakan metode ekstraksi QIAprep mini spin (seperti yang telah dijelaskan sebelumnya pada halaman 30, subjudul 3.3.1.5). Hasil isolasi plasmid rekombinan kemudian dianalisis dengan elektroforesis pada gel agarosa 0,8%. Berdasarkan analisis ini dapat diketahui adanya plasmid rekombinan dengan melihat perbedaan pola migrasi antara plasmid rekombinan pcDNA3.1HisA-IRES MLV-NA dengan klon pcDNA3.1HisA-NA yang berasal dari kontrol negatif ligasi.

### 3.3.2.6 Identifikasi klon pcDNA3.1/HisA-IRES MLV-NA

Identifikasi klon untuk mengetahui adanya DNA sisipan IRES MLV dan arah orientasi dilakukan dengan teknik PCR dan enzim restriksi endonuklease.

#### a) Identifikasi dengan enzim restriksi endonuklease

Pada proses identifikasi klon dengan enzim restriksi, klon pcDNA3.1/HisA-IRES MLV-NA dan klon pcDNA3.1/HisA-NA yang berasal dari kontrol negatif ligasi dipotong dengan enzim restriksi EcoRV, sedangkan plasmid pcDNA3.1/HisA tidak dipotong enzim restriksi EcoRV digunakan sebagai kontrol negatif. Jika hasil pemotongan klon pcDNA3.1/HisA-IRES MLV-NA dengan enzim EcoRV menghasilkan plasmid linier, yaitu pita DNA tunggal dengan panjang lebih kurang 7220 pb, maka klon mengandung sisipan DNA IRES MLV. Sebaliknya, kontrol negatif ligasi memperlihatkan pita DNA tunggal dengan panjang ukuran sesuai ukuran plasmid rekombinan pcDNA3.1/HisA-NA, yaitu lebih kurang 6800 pb.

#### b) Identifikasi dengan teknik PCR

Untuk identifikasi klon pcDNA3.1/HisA-IRES MLV-NA melalui teknik PCR *hotstar* digunakan pasangan primer MLVF dengan N1R320 dan primer MLVR dengan N1R320. Klon yang diduga mengandung sisipan DNA IRES MLV (pcDNA3.1/HisA-IRES MLV-NA) dan kontrol negatif ligasi digunakan sebagai cetakan DNA. Produk PCR yang dihasilkan dari pasangan primer MLVF dengan N1R320 memperlihatkan pita DNA dengan panjang lebih kurang 750 pb dan dari pasangan MLVR dengan N1R320 tidak terdapat pita DNA, maka klon mengandung sisipan DNA IRES MLV dengan arah orientasi benar, sesuai yang diperlukan.

### 3.3.3 Pengsubklonaan fragmen IRES HIV-bsf#1 ke dalam plasmid rekombinan pcDNA3.1/HisA-IRES MLV-NA#1 pada situs restriksi NotI dan EcoRV

#### 3.3.3.1 Persiapan fragmen DNA sisipan IRES HIV-bsf ( $\pm$ 500 pb)

Fragmen IRES HIV-bsf dengan panjang lebih kurang 500 pb diperoleh melalui pemotongan klon pKS-IRES HIV-bsf#1 dengan enzim restriksi XhoI dan NotI. Reaksi pemotongan dilakukan dengan campuran reaksi 10 x *Bovine Serum Albumin* (BSA), 10 x dapar NE 2 (50 mM *sodium chloride*, 10 mM *tris-chloride acide*, 10 mM *magnesium chloride*, 1 mM *dithithreitol*), enzim XhoI (Research Biolabs) dan air demineralisata (Sigma). Campuran reaksi pemotongan diinkubasi pada suhu 37°C selama satu jam. Setelah pemotongan klon dengan enzim restriksi XhoI, dilakukan purifikasi dengan metode kolom sesuai prosedur Qiaex II. Kemudian hasil pemotongan *sticky end* dibuat menjadi *blunt end* dengan metode *blunt end polish* melalui teknik PCR dengan enzim *platinum pfx DNA polimerase*. Sebelum dilanjutkan pemotongan klon dengan enzim restriksi NotI, pKS-IRESHIV-bsf#1-XhoI (*blunt*) dipurifikasi dengan metode kolom (Qiaex II). Reaksi pemotongan dilakukan dengan campuran reaksi 10 x *Bovine Serum Albumin* (BSA), 10 x dapar NE 3 (100 mM *sodium chloride*, 50 mM *tris-chloride acide*, 10 mM *magnesium chloride*, 1 mM *dithiothreitol*), enzim NotI (Research Biolabs) dan air demineralisata (Sigma). Campuran reaksi pemotongan diinkubasi pada suhu 37°C selama satu jam. Pemastian hasil pemotongan dengan enzim restriksi dianalisis menggunakan elektroforesis gel agarosa 10%.

Selanjutnya, plasmid rekombinan pKS-IRES HIV-bsf#1-*blunt*-NotI dianalisis menggunakan elektroforesis gel LMA 1% mengandung ungu kristal 1,6 $\mu$ g/mL untuk pewarnaan DNA. Kemudian potongan gel fragmen IRES HIV-bsf (*blunt*) dipurifikasi dengan metode *QIAEX II purification kit* [Qiagen].<sup>15</sup> Fragmen IRES HIV-bsf disebut QGIRES HIV-bsf-*blunt*-NotI. Pemastian hasil isolasi gel dianalisis menggunakan elektroforesis gel agarosa 10%.

### 3.3.3.2 Persiapan vektor pcDNA3.1/HisA-NA-MLV#1

Untuk pengsubklonaaan fragmen IRES HIV-bsf#1 *blunt*-NotI ke dalam vektor *back bone*, vektor pcDNA3.1/HisA-NA-MLV#1 dipotong dengan enzim restriksi endonuklease NotI dan diinkubasi pada suhu 37°C selama satu malam. Setelah hasil pemotongan dipurifikasi dengan metode QIAEX II, dilanjutkan pemotongan dengan enzim EcoRV. Pemastian hasil pemotongan pcDNA3.1/HisA-NA-MLV#1-NotI-EcoRV dianalisis menggunakan elektroforesis gel LMA 0,8%. Metode purifikasi gel agarosa sesuai dengan prosedur dari QIAEX II, Qiagen.<sup>15</sup>

### 3.3.3.3 Ligasi DNA sisipan ke dalam vektor

Hasil isolasi gel, sebagai vektor QGpcDNA3.1/HisA-NA-MLV#1-NotI-EcoRV diligasi dengan fragmen QGIRES HIV-bsf-*blunt*-NotI dengan perbandingan vektor dan sisipan DNA adalah 1:3. Untuk kontrol negatif ligasi disiapkan sesuai dengan cara sama, namun tidak mengandung DNA sisipan. Setelah proses ligasi pada suhu 16°C selama 16 jam, hasil ligasi ditransformasi pada sel hospes *E. coli* TOP 10 yang telah dibuat menjadi sel kompeten pada suhu dingin.

### 3.3.3.4 Transformasi hasil ligasi

Transformasi dilakukan dengan metode *heat shock* CaCl<sub>2</sub> (seperti yang telah dijelaskan sebelumnya pada halaman 29, subjudul 3.3.1.4). Koloni putih yang tumbuh pada media LB agar mengandung 50 µg/mL ampisilin adalah plasmid rekombinan yang berisi DNA sisipan IRES HIV-bsf. Klon yang tumbuh dipilih secara acak, dibuat replika pada media LB agar mengandung ampisilin 50 µg/mL dan dinokulasi ke dalam media LB cair yang mengandung ampisilin 100 µg/mL, kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 16 jam.

### 3.3.3.5 Isolasi plasmid rekombinan pcDNA3.1HisA-IRES MLV-NA-IRES HIV-bsf

Plasmid rekombinan pcDNA3.1HisA-IRES MLV-NA-IRES HIV-bsf diisolasi dari bakteri *E. coli* TOP 10 menggunakan metode ekstrasi QIAprep mini spin, Qiagen (seperti yang telah dijelaskan sebelumnya pada halaman 30, subjudul



3.3.1.5). Hasil isolasi plasmid rekombinan kemudian dianalisis dengan elektroforesis pada gel agarosa 0,8%. Berdasarkan analisis ini dapat diketahui adanya plasmid rekombinan dengan melihat perbedaan pola migrasi antara plasmid rekombinan pcDNA3.1HisA-IRES MLV-NA-IRES HIV-bsf dengan klon pcDNA3.1HisA-IRES MLV-NA yang berasal dari kontrol negatif ligasi.

### 3.3.3.6 Identifikasi klon pcDNA3.1HisA-IRES MLV-NA-IRES HIV-bsf

Identifikasi klon untuk mengetahui adanya DNA sisipan IRES MLV dan arah orientasi dilakukan dengan teknik PCR dan enzim restriksi.

#### a) Identifikasi dengan enzim restriksi endonuklease

Identifikasi klon pcDNA3.1/HisA-IRES MLV-NA-IRES HIV-bsf dan klon pcDNA3.1/HisA-NA yang berasal dari kontrol negatif ligasi dipotong dengan enzim restriksi endonuklease KpnI dan XbaI, sedangkan plasmid pcDNA3.1/HisA yang tidak dipotong dengan enzim restriksi KpnI dan XbaI digunakan sebagai kontrol negatif. Reaksi pemotongan dengan enzim restriksi endonuklease KpnI dilakukan dengan campuran reaksi 10 x *Bovine Serum Albumin* (BSA), 10 x dapar KpnI, enzim KpnI (Research Biolabs) dan air demineralisata (Sigma). Campuran reaksi pemotongan diinkubasi pada suhu 37°C selama dua jam. Setelah pemotongan klon dengan enzim restriksi KpnI, dilakukan purifikasi dengan metode kolom sesuai prosedur Qiaex II, kemudian dilanjutkan dengan pemotongan menggunakan enzim restriksi endonuklease XbaI. Reaksi pemotongan dilakukan dengan campuran reaksi 10 x *Bovine Serum Albumin* (BSA), 10 x dapar NE 2 (50 mM *sodium chloride*, 10 mM *tris-chloride acide*, 10 mM *magnesium chloride*, 1 mM *dithithreitol*), enzim XhoI (Research Biolabs) dan air demineralisata (Sigma). Campuran reaksi pemotongan diinkubasi pada suhu 37°C selama satu malam. Jika hasil pemotongan klon pcDNA3.1/HisA-IRES MLV-NA-IRES HIV-bsf dengan enzim KpnI dan XbaI menghasilkan tiga pita DNA, yaitu vektor ( $\pm 5760$  pb), sisipan fragmen NA ( $\pm 1340$  pb) dan fragmen IRES HIV-bsf ( $\pm 600$  pb), maka klon mengandung DNA sisipan IRES HIV-bsf. Sebaliknya, kontrol negatif ligasi memperlihatkan pita DNA vektor ( $\pm 5760$  pb) dan sisipan fragmen NA ( $\pm 1340$  pb).

### b) Identifikasi dengan teknik PCR

Identifikasi klon pcDNA3.1/HisA-IRES MLV-NA-IRES HIV-bsf melalui teknik PCR *hotstar* digunakan pasangan primer HIVF dengan HIVR dan primer BSFF dengan HIVR. Klon yang diduga mengandung DNA sisipan IRES HIV-bsf (pcDNA3.1/HisA-IRES MLV-NA-IRES HIV-bsf) digunakan sebagai cetakan DNA. Produk PCR yang dihasilkan dari pasangan primer HIVF dengan HIVR memperlihatkan pita DNA IRES HIV dengan panjang lebih kurang 280 pb dan pita DNA IRES HIV-bsf dengan panjang lebih kurang 600 pb. Pasangan primer BSFF dengan HIVR menghasilkan pita DNA bsf dengan panjang lebih kurang 280 pb dan pita DNA IRES HIV-bsf dengan panjang lebih kurang 600 pb. Dengan demikian, klon mengandung DNA sisipan IRES HIV-bsf.

### 3.3.4 Pengsubklonaan fragmen HA ke dalam plasmid rekombinan pcDNA3.1/HisA-IRES MLV-NA-IRES HIV-bsf#17 pada situs restriksi XbaI (*blunt*) dan ApaI

#### 3.3.4.1 Persiapan fragmen HA ( $\pm$ 1700 pb)

Fragmen HA yang disubklona ke dalam vektor *backbone* pcDNA3.1/HisA-IRES MLV-NA-IRES HIV-bsf diperoleh melalui pemotongan klon pcDNA5/FRT-HAsc#10 dengan enzim restriksi endonuklease HindIII dan ApaI. Reaksi pemotongan dengan enzim restriksi HindIII dilakukan dengan campuran reaksi 10 x *Bovine Serum Albumin* (BSA), 10 x dapar NE 2 (50 mM *sodium chloride*, 10 mM *tris-chloride acide*, 10 mM *magnesium chloride*, 1 mM *dithithreitol*), enzim HindIII (*Research Biolabs*) dan air demineralisata (*Sigma*). Campuran reaksi pemotongan diinkubasi pada suhu 37°C selama satu jam. Setelah pemotongan klon dengan enzim restriksi HindIII, dilakukan purifikasi dengan metode kolom sesuai prosedur Qiaex II. Kemudian hasil pemotongan *sticky end* dibuat menjadi *blunt end* dengan metode *blunt end polish* melalui teknik PCR dengan enzim *platinum pfx DNA polymerase*. Sebelum dilanjutkan pemotongan klon dengan enzim restriksi ApaI, pcDNA5/FRT-HAsc-HindIII (*blunt*) dipurifikasi dengan metode kolom (Qiaex II). Reaksi pemotongan dilakukan dengan campuran reaksi 10 x *Bovine Serum Albumin* (BSA), 10 x dapar NE 4

(50 mM potasium acetate, 20 mM tris-acetate, 10 mM magnesium acetate, 1 mM dithithreitol), enzim ApaI (Research Biolabs) dan air demineralisata (Sigma). Campuran reaksi pemotongan diinkubasi pada suhu ruang selama satu malam. Pemastian hasil pemotongan dengan enzim restriksi dianalisis menggunakan elektroforesis gel agarosa 0,8%. Selanjutnya, plasmid rekombinan pcDNA5/FRT-HAsc-HindIII (*blunt*)-ApaI dianalisis menggunakan elektroforesis gel LMA 0,8% mengandung ungu kristal 1,6 µg/mL untuk pewarnaan DNA. Kemudian potongan gel fragmen HA (*blunt*)-ApaI dipurifikasi dengan metode *Qiaex II purification kit* [Qiagen]. Fragmen HA (*blunt*)-ApaI disebut QGHA (*blunt*)-ApaI. Pemastian hasil isolasi gel dianalisis menggunakan elektroforesis gel agarosa 0,8%.

#### 3.3.4.2 Persiapan vektor pcDNA3.1/HisA-IRES MLV-NA-IRES HIV-bsf

Vektor pcDNA3.1/HisA-IRES MLV-NA-IRES HIV-bsf#17 untuk pengsubklonaaan fragmen HA (*blunt*)-ApaI ke dalam vektor *backbone* dipotong dengan enzim restriksi endonuklease XbaI dan ApaI. Reaksi pemotongan dengan enzim restriksi XbaI dilakukan dengan campuran reaksi 10 x *Bovine Serum Albumin* (BSA), 10 x dapar NE 2 (50 mM *sodium chloride*, 10 mM *tris-chloride acide*, 10 mM *magnesium chloride*, 1 mM *dithithreitol*), enzim HindIII (Research Biolabs) dan air demineralisata (Sigma). Campuran reaksi pemotongan diinkubasi pada suhu 37°C selama satu malam. Setelah pemotongan klon dengan enzim restriksi XbaI, dilakukan purifikasi dengan metode kolom sesuai prosedur *Qiaex II*. Kemudian hasil pemotongan *sticky end* dibuat menjadi *blunt end* dengan metode *blunt end polish* melalui teknik PCR dengan enzim *platinum pfx DNA polimerase*. Sebelum dilanjutkan pemotongan klon dengan enzim restriksi ApaI, pcDNA3.1/HisA-IRES MLV-NA-IRES HIV-bsf (*blunt*) dipurifikasi dengan metode kolom (*QIAEX II*). Reaksi pemotongan dilakukan dengan campuran reaksi 10 x *Bovine Serum Albumin* (BSA), 10 x dapar NE 4 (50 mM *potasium acetate*, 20 mM *tris-acetate*, 10 mM *magnesium acetate*, 1 mM *dithithreitol*), enzim ApaI (Research Biolabs) dan air demineralisata (Sigma). Campuran reaksi pemotongan diinkubasi pada suhu ruang selama satu malam. Pemastian hasil pemotongan dengan enzim restriksi dianalisis menggunakan elektroforesis gel agarosa 0,8%. Selanjutnya, plasmid rekombinan pcDNA3.1/HisA-IRES MLV-

NA-IRES HIV-bsf(*blunt*)-ApaI dianalisis menggunakan elektroforesis gel LMA 0,8% mengandung ungu kristal 1,6 µg/mL untuk pewarnaan DNA. Kemudian potongan gel fragmen HA (*blunt*)-ApaI dipurifikasi dengan metode *Qiaex II purification kit* [Qiagen]. Fragmen pcDNA3.1/HisA-IRES MLV-NA-IRES HIV-bsf (*blunt*)-ApaI disebut pcDNA3.1/HisA-IRES MLV-NA-IRES HIV-bsf (*blunt*)-ApaI. Pemastian hasil isolasi gel dianalisis menggunakan elektroforesis gel agarosa 0,8%.

#### 3.3.4.3 Ligasi DNA sisipan ke dalam vektor

Fragmen QGHA (*blunt*)-ApaI diligasi dengan fragmen pcDNA3.1/HisA-IRES MLV-NA-IRES HIV-bsf (*blunt*)-ApaI dengan perbandingan vektor dan DNA sisipan adalah 1:3. Untuk kontrol negatif ligasi disiapkan sesuai dengan cara sama, namun tidak mengandung DNA sisipan. Setelah proses ligasi pada suhu 16°C selama 16 jam, hasil ligasi ditransformasi pada sel hospes *E. coli* TOP 10 yang telah dibuat menjadi sel kompeten pada suhu dingin.

#### 3.3.4.4 Transformasi hasil ligasi

Transformasi dilakukan dengan metode *heat shock* CaCl<sub>2</sub> (seperti yang telah dijelaskan sebelumnya pada halaman 29, subjudul 3.3.1.4). Koloni putih yang tumbuh pada media LB agar mengandung 50 µg/mL ampisilin adalah plasmid rekombinan yang berisi sisipan fragmen HA. Klon yang tumbuh dipilih secara acak, dibuat replika pada media LB agar mengandung ampisilin 50 µg/mL dan dinokulasi ke dalam media LB cair yang mengandung ampisilin 100 µg/mL, kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 16 jam.

#### 3.3.4.5 Isolasi plasmid rekombinan pcDNA3.1HisA-IRES MLV-NA-IRES HIV-bsf-HA

Plasmid rekombinan pcDNA3.1HisA-IRES MLV-NA-IRES HIV-bsf-HA diisolasi dari bakteri *E. coli* T.10 menggunakan metode ekstraksi Qiagen (lihat halaman 30, subjudul 3.3.1.5). Hasil isolasi plasmid rekombinan kemudian dianalisis dengan elektroforesis pada gel agarosa 0,8%. Berdasarkan analisis ini dapat diketahui adanya plasmid rekombinan dengan melihat perbedaan pola

migrasi antara plasmid rekombinan pcDNA3.1HisA-IRES MLV-NA-IRES HIV-bsf-HA dengan klon pcDNA3.1HisA-IRES MLV-NA-IRES HIV-bsf-HA yang berasal dari kontrol negatif ligasi.

#### **3.3.4.6 Identifikasi klon pcDNA3.1HisA-IRES MLV-NA-IRES HIV-bsf-HA**

Identifikasi klon untuk mengetahui adanya sisipan fragmen HA dan arah orientasi dilakukan dengan pemotongan menggunakan enzim restriksi dan sekuensing.

##### **a) Identifikasi dengan enzim restriksi endonuklease**

Pada proses identifikasi klon dengan enzim restriksi, klon pcDNA3.1/HisA-IRES MLV-NA-IRES HIV-bsf-HA dan klon pcDNA3.1/HisA-IRES MLV-NA-IRES HIV-bsf yang berasal dari kontrol negatif ligasi dipotong dengan enzim restriksi ApaI, sedangkan plasmid pcDNA3.1/HisA yang tidak dipotong dengan enzim restriksi ApaI digunakan sebagai kontrol negatif. Jika hasil pemotongan klon pcDNA3.1/HisA-IRES MLV-NA-bsf-IRES HIV-HA dengan enzim ApaI menghasilkan plasmid linier, yaitu berupa pita DNA tunggal dengan panjang lebih kurang 9520 pb, maka klon mengandung sisipan fragmen HA. Sebaliknya, kontrol negatif ligasi hanya memperlihatkan pita DNA pcDNA3.1/HisA-IRES MLV-NA-IRES HIV-bsf dengan panjang lebih kurang 7820 pb. Selanjutnya, dilakukan identifikasi klon dengan enzim restriksi endonuklease Xba untuk melihat sisipan fragmen HA yang mempunyai 3 situs restriksi Xba posisi 210 pb, 1335 pb, 1392 pb dan posisi 1074 pb pada vektor. Pemotongan dengan enzim restriksi Xba menghasilkan 4 fragmen DNA dengan ukuran 7133 pb, 1185 pb, 884 pb dan 318 pb.

##### **b) Identifikasi DNA sisipan dengan teknik *sequencing***

Identifikasi arah orientasi dan susunan nukleotida fragmen IRES MLV dan fragmen NA pada posisi 320 pb dari arah 3' ke 5' dilakukan dengan menggunakan primer N1R320. Homologi sekuen IRES MLV dalam klon pcDNA3.1/His A-IRES MLV-NA-bsf-IRES HIV-HA dianalisis dengan membandingkan hasil *sequencing* dengan sekuen gen pAMS (diakses dari *genbank*, nomor versi akses AF010170; tahun 2000), sedangkan homologi sekuen fragmen NA dibandingkan

dengan isolat dari manusia (A/Indonesia/5/2005). Primer H1413F digunakan untuk mengetahui arah orientasi dan susunan nukleotida fragmen HA pada posisi 1413 pb dari arah 5' ke arah 3'. Homologi sekuen fragmen HA dianalisis dengan membandingkan hasil *sequencing* dengan isolat dari manusia (A/Indonesia/5/2005). Verifikasi fragmen *full length* HA, NA dan IRES HIV telah dilakukan oleh Laboratorium IHVCB-UI. Verifikasi DNA sisipan, arah orientasi, dan akurasi susunan nukleotida klon pcDNA3.1/HisA-IRES MLV-NA-IRES-bsf-HIV-HA #6 dilakukan dengan menggunakan teknik *sequencing* di Yayasan Geneka Eijkman Institute for Molecular Biology, Jakarta.

Hasil *sequencing* diolah dengan menggunakan elektroferogram dan analisis homologi sekuen dilakukan menggunakan perangkat lunak BIOEDIT versi 7.0.



## BAB 4

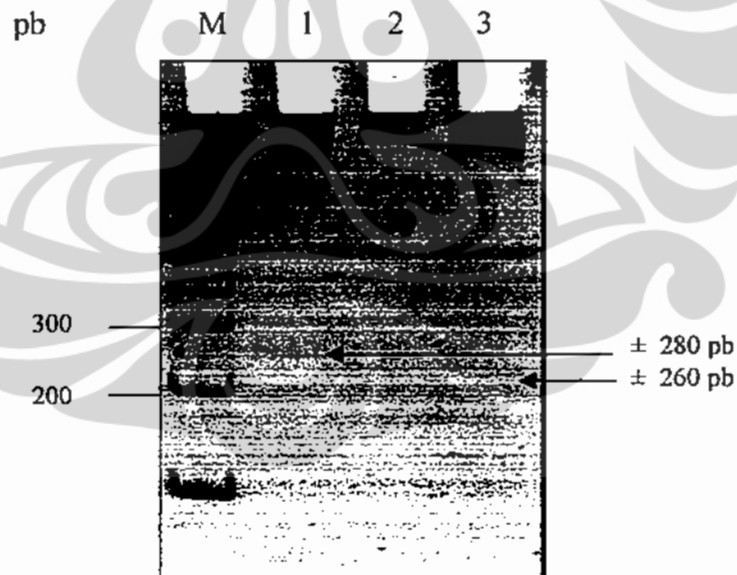
### HASIL DAN PEMBAHASAN

#### 4.1 Hasil

##### 4.1.1 Pengsubklonaaan BSF ke dalam plasmid rekombinan pKS IRES HIV# 2 pada situs restriksi EcoRV

###### 4.1.1.1 Pemastian arah orientasi pKS-IRESHIV# 2

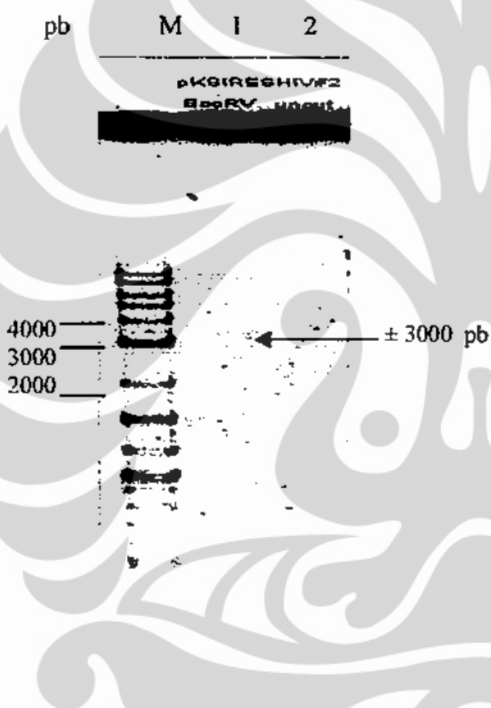
Pemastian arah orientasi terbalik pKS-IRES HIV (3' ke 5') menggunakan enzim restriksi HindIII dan NheI yang dianalisis pada gel agarosa 0,8 % (gambar 4.1) menunjukkan adanya pita DNA fragmen IRES HIV dengan panjang lebih kurang 260 pb dan pita DNA vektor panjang 2981 pb. Hasil pemotongan menggunakan enzim restriksi SacII menghasilkan DNA fragmen IRES HIV dengan panjang lebih kurang 280 pb dan pita DNA vektor 2961 pb. Pemotongan dengan enzim restriksi tersebut membuktikan dalam plasmid pKS-IRESHIV # 2 mempunyai arah orientasi terbalik, yaitu dari arah 3' ke arah 5'.



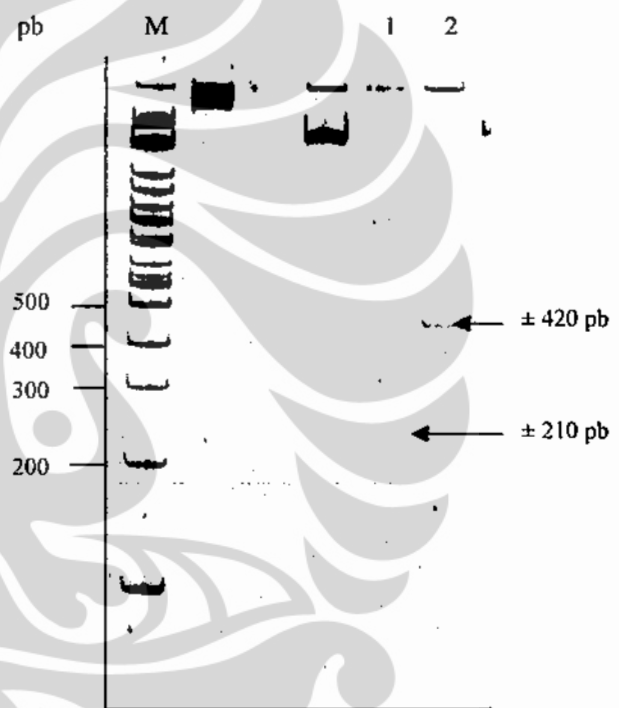
Gambar 4.1. Analisis hasil pemotongan pKS-IRES HIV# 2 dengan enzim restriksi endonuklease pada gel poliakrilamid 10 %. M: marka 2 log; lajur 1: fragmen IRES HIV ± 280 pb (pKS-IRES HIV# 2 dipotong enzim SacII); lajur 2: -; lajur 3: fragmen IRES HIV ± 260 pb (pKS-IRES HIV# 2 dipotong enzim HindIII-NheI). Tanda → : fragmen yang dihasilkan.

#### 4.1.1.2 Pemotongan plasmid rekombinan

Pemotongan plasmid rekombinan pKS-IRES HIV# 2 dengan enzim restriksi endonuklease EcoRV sebagai vektor untuk pengsubklonaaan fragmen BSF, menghasilkan vektor yang linier dengan panjang lebih kurang 3000 pb. Berdasarkan hasil analisis pada gel agarosa 0,8% terlihat bahwa vektor pKS-IRESHIV-EcoRV-*blunt* terpotong sempurna, demikian juga dengan hasil purifikasi (gambar 4.2). Gambar 4.2, hasil analisis pada gel poliakrilamid 10% menunjukkan pita DNA tunggal panjang lebih kurang 210 pb yang merupakan fragmen BSF *blunt* yang digunakan sebagai DNA sisipan.



Gambar 4.2. Analisis hasil pemotongan pKS-IRESHIV# 2 dengan enzim restriksi endonuklease EcoRV pada elektroforesis gel agarosa 0,8%. M: marka 2 log; lajur 1: pKS-IRESHIV# 2-EcoRV (fragmen + 3000 pb; plasmid terpotong linier); lajur 2: pKS-IRESHIV# 2 yang tidak dipotong enzim EcoRV. Tanda → : fragmen yang dihasilkan.



Gambar 4.3. Analisis hasil purifikasi fragmen BSF *blunt* dan QG-MLV *blunt* pada elektroforesis gel agarosa 0,8%. M: marka 2 log; lajur 1: fragmen BSF *blunt* (± 210 pb); lajur 2: QG-MLV *blunt* (± 420 pb). Tanda → : fragmen yang dihasilkan.

Hasil transformasi produk ligasi pKS-IRESHIV# 2-EcoRV dan fragmen BSF *blunt* menghasilkan 7 klon yang tumbuh pada LB agar, sedangkan koloni yang tumbuh dari kontrol negatif ligasi (produk ligasi yang tidak mengandung DNA



sisipan BSF) berjumlah 70 klon dan kontrol positif untuk melihat kompetensi sel *E. coli* TOP 10 yang menggunakan plasmid pBluescript KS(-) menghasilkan sejumlah lebih kurang 300 koloni. Hal ini menunjukkan bahwa sel mempunyai kemampuan untuk melakukan proses transformasi hasil ligasi. Kontrol negatif sel kompeten *E. coli* TOP 10 memperlihatkan tidak ada pertumbuhan koloni, sesuai yang diharapkan. Oleh karena koloni yang tumbuh pada media LB agar hanya berjumlah 7 klon, maka semua klon diinokulasi pada media LB cair dan dibuat replika pada media LB agar. Berdasarkan analisis hasil isolasi plasmid rekombinan pKS-IRESHIV-bsf pada gel agarosa 0,8%, terlihat ada perbedaan pola migrasi DNA plasmid sirkuler antara plasmid rekombinan pKS-IRES HIV-bsf dengan klon pKS-IRES HIV#2 yang berasal dari kontrol negatif ligasi, yaitu klon nomor 1, 3 dan 4 (gambar 4.4). Perbedaan pola migrasi DNA plasmid sirkuler menunjukkan plasmid rekombinan diduga mengandung DNA sisipan BSF ( $\pm 210$  pb).



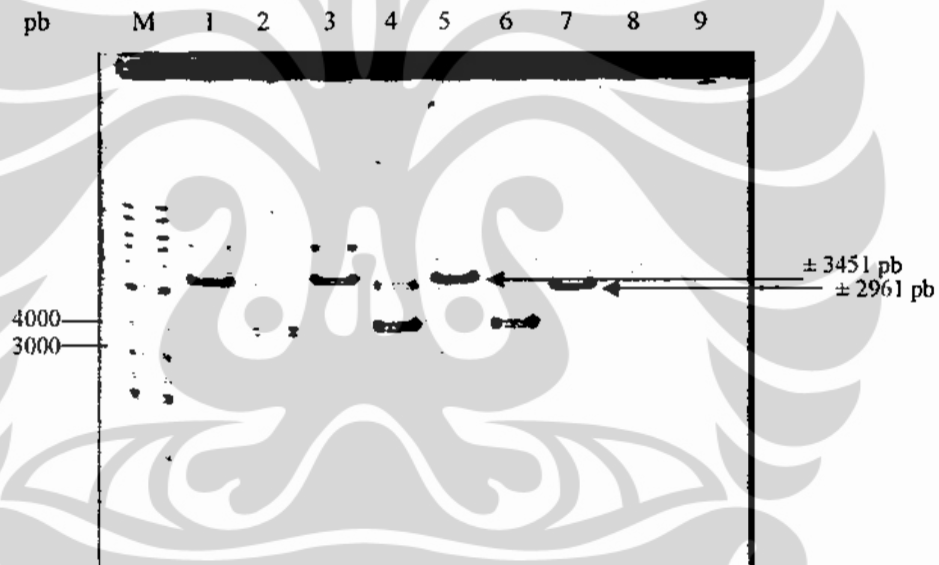
Gambar 4.4. Identifikasi plasmid mengandung DNA sisipan pada koloni *E.coli* nomor 1-7 hasil transformasi produk ligasi pKS-IRESHIV dengan sisipan BSF, berdasarkan perbedaan pola migrasi DNA plasmid sirkuler pada elektroforesis gel agarosa 0,8%. Tanda  $\rightarrow$  : klon no. 1, 3 dan 4 diduga mengandung DNA sisipan BSF; K(-): kontrol negatif ligasi (produk ligasi tidak mengandung DNA sisipan BSF).

#### 4.1.1.3 Identifikasi klon pKS-IRESHIV-bsf

##### a) Identifikasi klon menggunakan enzim restriksi endonuklease

Identifikasi klon pKS-IRESHIV-bsf yang diduga mengandung fragmen DNA sisipan, dilakukan dengan cara klon dipotong menggunakan enzim restriksi

endonuklease BamHI dan reaksi PCR menggunakan enzim *hotstar Taq polymerase*. Pemotongan klon nomor 1, 3 dan 4 menggunakan enzim restriksi endonuklease BamHI dilakukan untuk pemastian adanya sisipan fragmen BSF ( $\pm 210$  pb). Pemotongan dengan enzim restriksi endonuklease BamHI seharusnya menghasilkan pita DNA tunggal (linier) panjang lebih kurang 3451 pb, namun pada klon pKS-IRESHIV-bsf # 1 dan 3 terlihat ada pita DNA yang tidak spesifik selain pita DNA ukuran 3451 pb. Kontrol negatif plasmid pKS-IRES HIV yang dipotong dengan enzim BamHI memperlihatkan pita DNA tunggal dengan panjang lebih kurang 3241 pb, sesuai dengan yang diharapkan. Gambar 4.5 menunjukkan ada perbedaan ukuran panjang DNA antara pita DNA pKS-IRESHIV-bsf-BamHI dan kontrol negatif-BamHI.

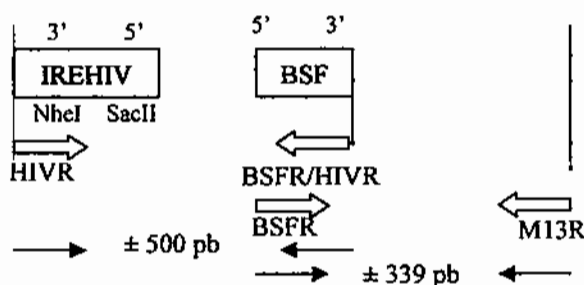


Gambar 4.5. Analisis hasil pemotongan pKS-IRESHIV# 2-bsf dengan enzim restriksi endonuklease BamHI pada elektroforesis gel agarosa 1%. M: marka 2 log; lajur 1, 3: klon pKS-IRESHIV-bsf # 1 dan # 3-BamHI (plasmid belum terpotong sempurna) dan lajur 5: klon pKS-IRESHIV-bsf # 4-BamHI (pita DNA  $\pm 3451$  pb, plasmid terpotong linier); lajur 2, 4 dan 6: pKS-IRESHIV-bsf # 2 yang tidak dipotong enzim BamHI; lajur 7: kontrol negatif ligasi (produk yang tidak mengandung DNA sisipan BSF) dipotong dengan enzim BamHI (pita DNA  $\pm 2961$  pb, plasmid terpotong linier); lajur 8: kontrol negatif ligasi tidak dipotong dengan enzim BamHI. Tanda  $\longrightarrow$ : pada lajur 5 dan 7: terlihat ada perbedaan panjang pita DNA klon pKS-IRESHIV-bsf # 4-BamHI (pita DNA  $\pm 3451$  pb; plasmid terpotong linier) dibandingkan dengan panjang pita DNA kontrol negatif ligasi dipotong dengan enzim BamHI (pita DNA  $\pm 2961$  pb; plasmid terpotong linier).

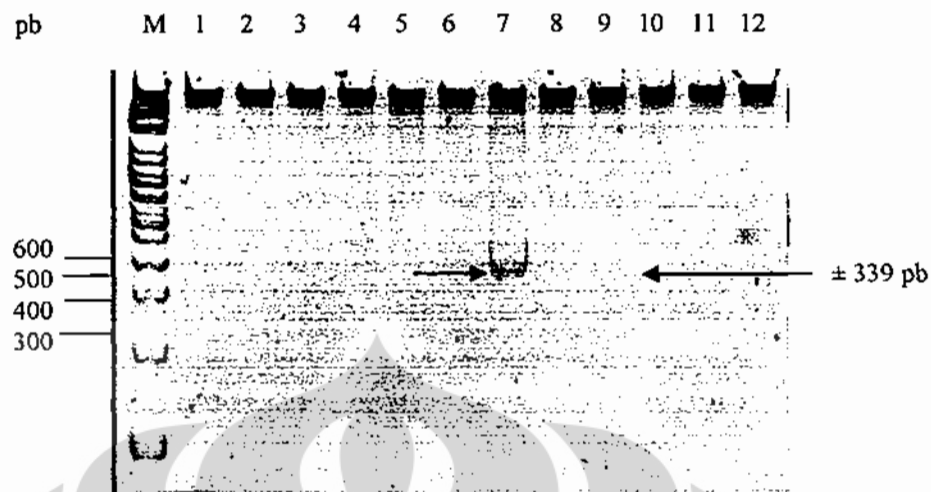
### b) Identifikasi klon menggunakan reaksi PCR

Identifikasi klon dilakukan dengan reaksi PCR *hotstar* menggunakan pasangan primer HIVR dengan BSFR/HIVR dan pasangan BSF *forward* (BSFF) dengan primer M13R (gambar 4.6). Amplikon klon nomor 1, 3, dan 4 yang diperoleh dari pasangan primer HIVR dengan BSFR tidak menghasilkan pita DNA, sehingga tidak sesuai dengan yang diharapkan (pita DNA mengandung fragmen IRES HIV dan BSF dengan panjang  $\pm 500$  pb). Sebaliknya, amplikon klon # 1, 3 dan 4 yang diperoleh dari pasangan BSFF dengan M13R memperlihatkan pita DNA tunggal dengan panjang lebih kurang 339 pb dan pada kontrol negatif ligasi tidak memperlihatkan pita DNA. Dengan demikian, klon mengandung DNA sisipan BSF dengan arah orientasi benar, sesuai yang diperlukan untuk pengklonaan. Amplikon kontrol positif menggunakan pasangan primer HIVR dan BSFR dengan cetakan DNA klon pKS-IRES HIV# 2, menunjukkan adanya pita DNA yang tidak spesifik dengan panjang lebih kurang 500 pb, dengan demikian tidak sesuai dengan yang diharapkan ( $\pm 280$  pb). Untuk amplikon kontrol positif yang diperoleh dari pasangan primer BSFF dan M13R dengan cetakan DNA klon pKS-IRES HIV# 2, memperlihatkan adanya pita DNA dengan panjang lebih kurang 600 pb (gambar 4.7). Amplikon kontrol negatif sebagai kontrol masing-masing pasangan primer dan air demineralisa (dw) yang digunakan untuk reaksi PCR memberikan hasil negatif, yaitu tidak ada pita DNA.

Berdasarkan hasil identifikasi dengan menggunakan enzim restriksi endonuklease dan reaksi PCR, diketahui bahwa pengsubklonaan fragmen BSF ke dalam vektor pKS-IRES HIV berhasil diperoleh 3 klon, yaitu klon nomor 1, 3 dan 4.



Gambar 4.6. Skema pasangan primer reaksi PCR *hotstar* pada plasmid pKS-IRES HIV# 2



Gambar 4.7. Identifikasi klon pKSIRESHIV-bsf # 1, 3 dan 4 menggunakan reaksi PCR *hotstar* pada elektroforesis gel poliakrilamid 10%. M: marka 2 log; lajur 1, 2, 3: klon pKS-IRES HIV-bsf # 1, 3, dan 4 menggunakan primer HIVR dan BSFR; lajur 4: kontrol positif pKS IRES HIV# 2 menggunakan primer HIVR dan BSFR (fragmen DNA  $\pm$  500 pb); lajur 5: kontrol negatif ligasi (produk ligasi tidak mengandung DNA sisipan BSF) menggunakan primer HIVR dan BSFR; lajur 6: kontrol negatif primer HIVR dan dw; lajur 7, 8, 9: klon pKS-IRES HIV-bsf # 1, 3, dan 4 menggunakan pasangan primer BSFF dan M13R (fragmen BSF  $\pm$  339 pb); lajur 10: kontrol positif pKS-IRES HIV# 2 menggunakan pasangan primer BSFF dan M13R; lajur 11: klon kontrol negatif ligasi (produk ligasi tidak mengandung DNA sisipan BSF) menggunakan pasangan primer BSFF dan M13R (fragmen DNA  $\pm$  600 pb); lajur 12: kontrol negatif pasangan primer BSFF dan M13R serta dw. Tanda  $\longleftrightarrow$ : klon pKS-IRESHIV-bsf # 1, 3, dan 4 mengandung DNA sisipan.

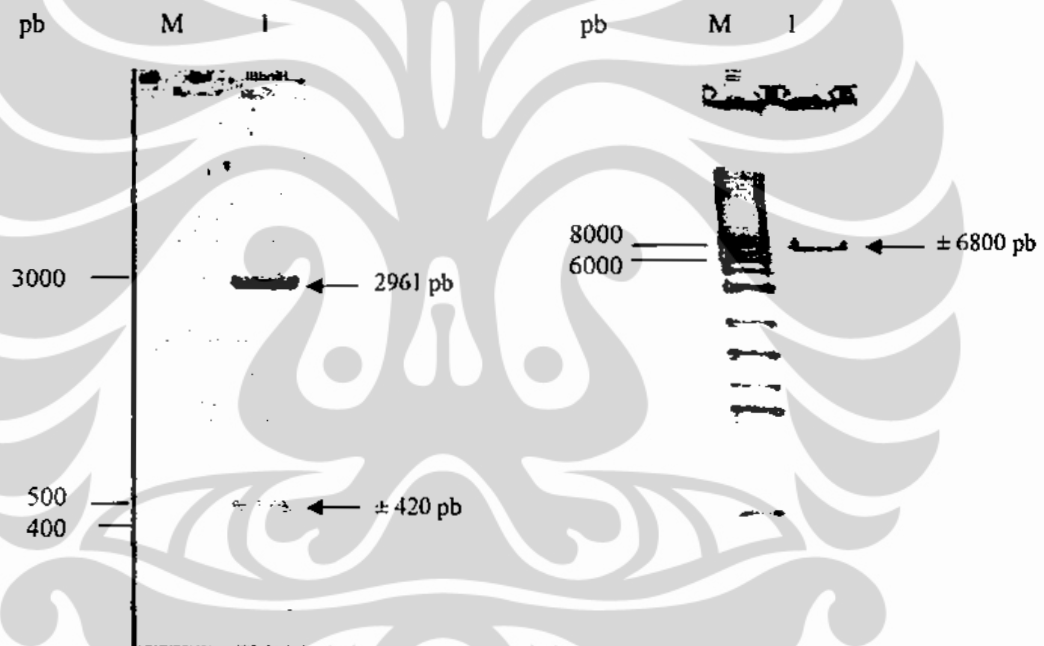
#### 4.1.2 Pengsubklonnan IRES MLV#4 ke dalam pcDNA3.1/HisA-NA pada situs HindIII

##### 4.1.2.1 Pemotongan plasmid rekombinan

Fragmen IRES MLV untuk digunakan sebagai DNA sisipan diperoleh dari plasmid rekombinan pKS-IRES MLV # 4 yang dipotong menggunakan enzim restriksi endonuklease HindIII. Hasil pemotongan dan purifikasi plasmid rekombinan dianalisis pada gel agarosa 1 % memperlihatkan fragmen IRES MLV dengan panjang lebih kurang 420 pb dan vektor dengan panjang 2961 pb (gambar 4.8). Analisis fragmen IRES MLV ( $\pm$  420 pb) pada gel LMA 1% mengandung ungu kristal untuk pewarnaan DNA telah berhasil dilakukan, dimana pada gel terlihat pita DNA fragmen IRES MLV berwarna ungu. Hasil analisis pada gel LMA 1% diperoleh fragmen DNA sisipan QG-IRESMLV-HindIII.

Vektor pcDNA3.1/HisA-NA#2 berhasil dipotong dengan enzim restriksi endonuklease HindIII, dimana hasil analisis pada gel agarosa 1% memperlihatkan

adanya pita DNA tunggal lebih kurang 7220 pb (gambar 4.9). Namun, untuk pemastian bahwa vektor sudah terpotong sempurna dilakukan transformasi DNA plasmid yang telah dipurifikasi pada sel kompeten *E. coli* TOP 10. Hasil transformasi memperlihatkan bahwa koloni yang tumbuh pada media LB agar berjumlah lebih besar dari 20 koloni, yaitu 200 koloni. Oleh karena itu, untuk mendapatkan vektor yang terpotong sempurna dilakukan isolasi dari gel LMA 0,8%. Sebelum isolasi dari gel LMA, dilakukan penambahan enzim CIP. Isolasi dari gel LMA menggunakan ungu kristal untuk pewarnaan DNA dengan tujuan menghindari kerusakan DNA. Hasil analisis pada gel LMA 0,8 % diperoleh fragmen DNA sisipan vektor QG-pcDNA3.1/HisA-NA-HindIII.



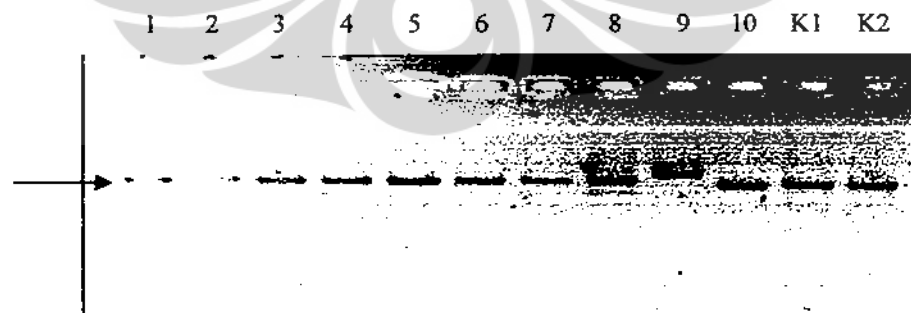
Gambar 4.8. Analisis hasil pemotongan pKS-IRES MLV dengan enzim restriksi endonuklease HindIII pada elektroforesis gel agarosa 1 %. M: marka 2 log; lajur 1: hasil potongan enzim berupa fragmen MLV ( $\pm 420$  pb) dan vektor (2961 pb).

Gambar 4.9. Analisis hasil pemotongan pcDNA3.1/HisA-NA dengan enzim restriksi HindIII (p)-CIP pada elektroforesis gel agarosa 0,8 %. M: marka 2log; lajur 1: pcDNA3.1/HisA-NA-HindIII-cip ( $\pm 6800$  pb)

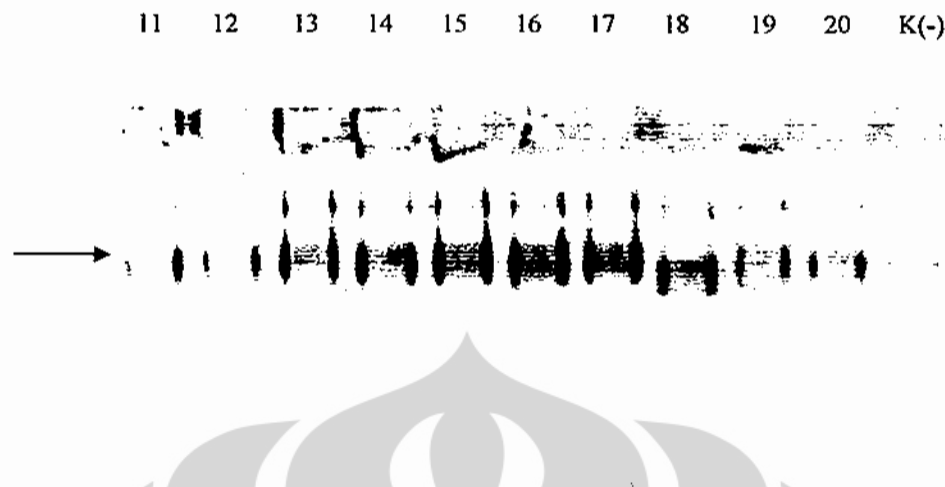
#### 4.1.2.2 Transformasi hasil ligasi

Berdasarkan hasil transformasi terhadap produk ligasi pcDNA3.1/HisA-NA-HindIII-cip dengan fragmen IRESMLV-HindIII diperoleh sejumlah 101 klon yang tumbuh pada LB agar, sedangkan koloni yang tumbuh dari kontrol negatif ligasi

(tidak mengandung DNA sisipan IRES MLV) berjumlah 3 klon. Kontrol positif, yaitu plasmid pcDNA3.1/HisA yang digunakan untuk melihat kompetensi sel *E. coli* TOP 10 menghasilkan sejumlah lebih kurang 115 koloni yang tumbuh. Dengan demikian, menunjukkan bahwa sel mempunyai kompetensi yang baik untuk melakukan proses transformasi hasil ligasi. Kontrol negatif sel kompeten *E. coli* TOP10 terlihat tidak ada pertumbuhan koloni, dengan demikian sel *E. coli* yang digunakan bebas dari kontaminasi, selain itu memperlihatkan bahwa sel *E. coli* resisten terhadap antibiotik ampisilin pada konsentrasi 50 µg/mL. Untuk identifikasi plasmid rekombinan, dari 101 klon yang tumbuh dipilih secara acak sejumlah 20 klon untuk dibuat replika pada media LB agar dan diinokulasi ke dalam media LB cair. Isolasi klon pcDNA3.1/HisA-IRES MLV-NA# 1-20 dilakukan 2 kali pada hari yang berbeda. Berdasarkan analisis hasil isolasi plasmid rekombinan pcDNA3.1/HisA-IRES MLV-NA pada gel agarosa 0,8%, terlihat ada perbedaan pola migrasi DNA plasmid sirkuler antara plasmid rekombinan pcDNA3.1/HisA-IRES MLV-NA dengan klon pcDNA3.1/HisA-NA yang berasal dari kontrol negatif ligasi, yaitu klon nomor 1-9, 11-17, dan 19-20 (gambar 4.10a dan 4.10b). Perbedaan pola migrasi DNA plasmid sirkuler menunjukkan plasmid rekombinan diduga mengandung DNA sisipan IRES MLV ( $\pm 420$  pb), namun pada klon # 9, pola migrasi DNA plasmid sirkuler terlihat lebih tinggi dibandingkan dengan klon lainnya. Perbedaan ini menunjukkan ada kemungkinan klon # 9 mengandung lebih dari satu sisipan fragmen DNA IRESMLV (gambar 4.10a).



Gambar 4.10a. Identifikasi plasmid mengandung DNA sisipan pada koloni *E. coli* nomor 1-10 hasil transformasi produk ligasi pcDNA3.1/HisA-IRESMLV dengan sisipan fragmen NA, berdasarkan perbedaan pola migrasi DNA plasmid sirkuler pada elektroforesis gel agarosa 0,8%. Tanda  $\rightarrow$ : klon no. 1-9 diduga mengandung DNA sisipan fragmen NA; K1, K2: kontrol negatif ligasi (produk ligasi tidak mengandung DNA sisipan).



Gambar 4.10b. Identifikasi plasmid mengandung DNA sisipan pada koloni *E.coli* nomor 11-20 hasil transformasi produk ligasi pcDNA3.1/HisA-IRESMLV dengan sisipan fragmen NA, berdasarkan perbedaan pola migrasi DNA plasmid sirkuler pada elektroforesis gel agarosa 0,8%. Tanda → : klon no. 11-17; 19, 20 diduga mengandung DNA sisipan fragmen NA; K(-): kontrol negatif ligasi (produk ligasi tidak mengandung DNA sisipan).

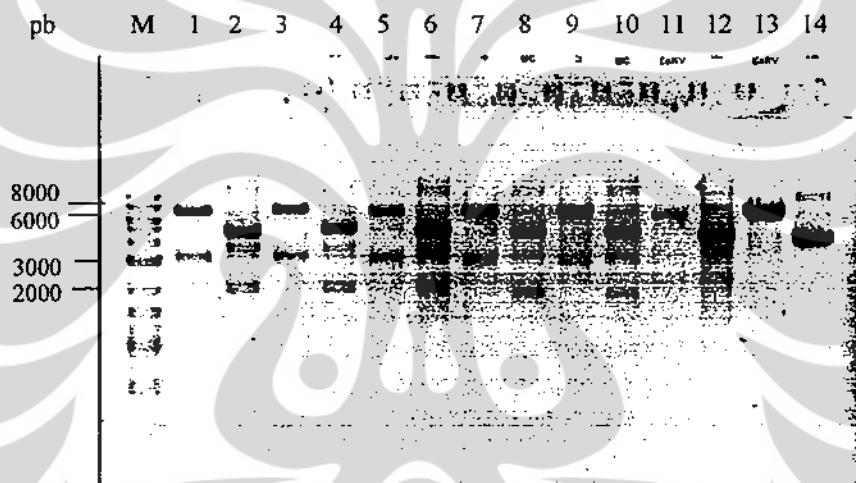
#### 4.1.2.3 Identifikasi klon pcDNA3.1/HisA-IRESMLV-NA

Identifikasi klon pcDNA3.1/HisA-IRES MLV-NA yang diduga mengandung fragmen DNA sisipan dipotong dengan enzim restriksi endonuklease EcoRV dan HindIII serta reaksi PCR menggunakan enzim *hotstar Taq polymerase*

##### a) Identifikasi klon menggunakan enzim restriksi endonuklease

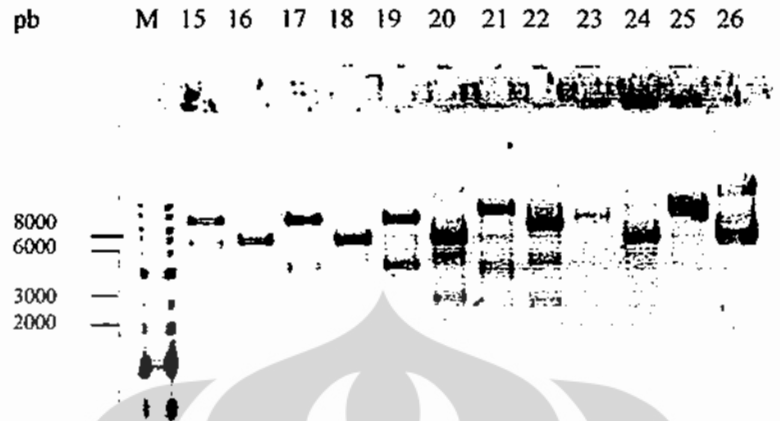
Identifikasi klon nomor 1-9, 11-17 dan 19-20 dipotong menggunakan enzim restriksi endonuklease EcoRV, diharapkan menghasilkan pita DNA tunggal (linier) panjang lebih kurang 7220 pb. Gambar 4.11a memperlihatkan hasil analisis pada gel agarosa 0,8% dari klon pcDNA3.1/HisA-IRES MLV-NA# 1-9 dipotong dengan enzim restriksi endonuklease EcoRV belum terpotong sempurna, karena terbentuk dua pita DNA dengan panjang basa ( $\pm 7000$  pb dan  $\pm 3000$  pb). Sebaliknya klon pcDNA3.1/HisA-IRES MLV-NA# 11-17, 19 dan 20 menunjukkan hasil pemotongan dengan enzim restriksi endonuklease EcoRV membentuk pita DNA tunggal (linier) panjang lebih kurang 7220 pb (gambar 4.11c. dan 4.11d.). Pemotongan klon pcDNA3.1/HisA-IRES MLV-NA# 1-9 dengan enzim restriksi endonuklease tidak sempurna kemungkinan dapat

disebabkan konsentrasi enzim restriksi endonuklease atau jumlah DNA yang digunakan tidak cukup untuk proses pemotongan plasmid rekombinan. Hasil analisis terhadap semua kontrol negatif ligasi (produk ligasi yang tidak mengandung DNA sisipan) maupun kontrol negatif vektor pcDNA3.1/HisA-NA (*wild type*) menunjukkan pemotongan dengan enzim EcoRV membentuk pita DNA tunggal (linier). Berdasarkan hasil analisis ini, dapat diketahui juga klon pcDNA3.1/HisA-IRES MLV-NA# 9 kemungkinan mengandung DNA sisipan IRESMLV lebih dari satu fragmen, karena terlihat ada perbedaan pola migrasi DNA plasmid sirkuler yang lebih tinggi dibandingkan dengan klon lainnya (gambar 4.11a. dan 4.11b).

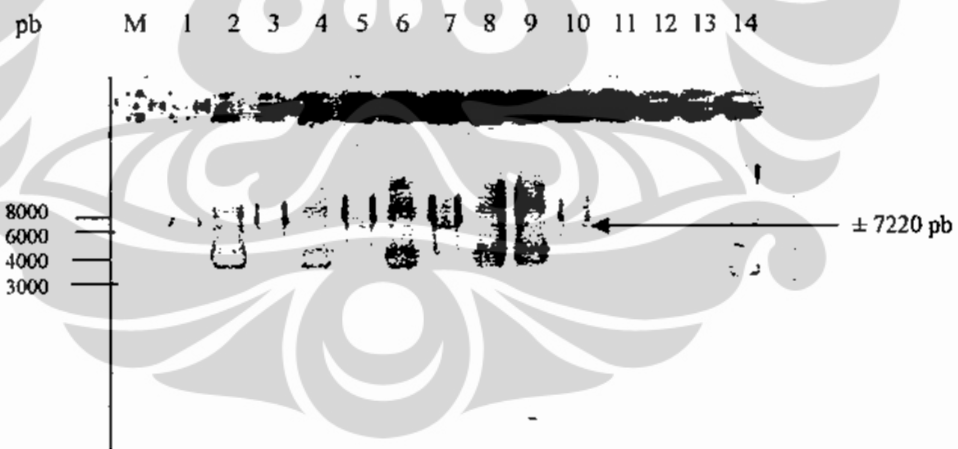


Gambar 4.11a. Analisis hasil pemotongan pcDNA3.1/HisA-IRES MLV-NA dengan enzim restriksi endonuklease EcoRV pada elektroforesis gel agarosa 0,8 %. M: marka 2 log; lajur 1, 3, 5, 7, 9: klon pcDNA3.1/HisA-IRES MLV-NA # 1-5 dipotong enzim endonuklease EcoRV (plasmid belum terpotong sempurna); lajur 2, 4, 6, 8, 10: klon # 1-5 yang tidak dipotong enzim restriksi endonuklease EcoRV; lajur 11: kontrol negatif ligasi (produk ligasi yang tidak mengandung DNA sisipan IRES MLV) dipotong enzim endonuklease EcoRV (pita DNA  $\pm$  6800 pb; plasmid terpotong linier); lajur 12: kontrol negatif ligasi yang tidak dipotong enzim EcoRV; lajur 13: kontrol plasmid rekombinan pcDNA3.1/HisA-NA#2 dipotong enzim restriksi endonuklease EcoRV ( $\pm$  6800 pb; plasmid terpotong linier); lajur 14: kontrol plasmid rekombinan pcDNA3.1/HisA-NA#2 yang tidak dipotong enzim restriksi endonuklease EcoRV.

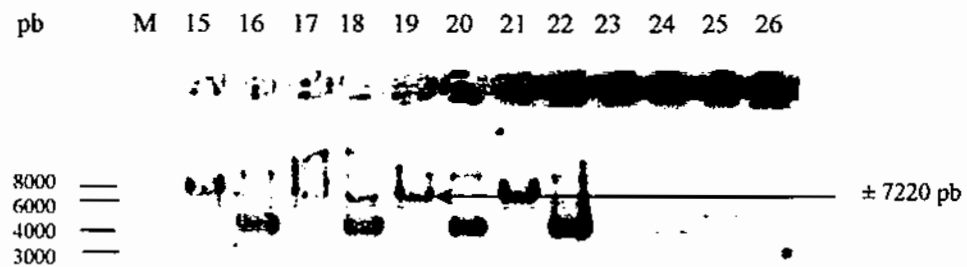




Gambar 4.11b. Analisis hasil pemotongan pcDNA3.1/HisA-IRES MLV-NA dengan enzim restriksi endonuklease EcoRV pada elektroforesis gel agarosa 0,8 %. M: marka 2 log; lajur 15, 17, 19, 21: klon pcDNA3.1/HisA-IRES MLV-NA # 6-9 dipotong enzim endonuklease EcoRV (plasmid belum terpotong sempurna); lajur 16, 18, 20, 22: klon # 6-9 yang tidak dipotong enzim restriksi endonuklease EcoRV; lajur 23: kontrol negatif ligasi (produksi ligasi tidak mengandung DNA sisipan IRES MLV) dipotong enzim endonuklease EcoRV (pita DNA  $\pm$  6800 pb; plasmid terpotong linier); lajur 24: kontrol negatif ligasi yang tidak dipotong enzim EcoRV; lajur 25: kontrol plasmid rekombinan pcDNA3.1/HisA-NA#2 dipotong enzim restriksi endonuklease EcoRV ( $\pm$  6800 pb; plasmid terpotong linier); lajur 26: kontrol plasmid rekombinan pcDNA3.1/HisA-NA#2 yang tidak dipotong enzim restriksi endonuklease EcoRV.

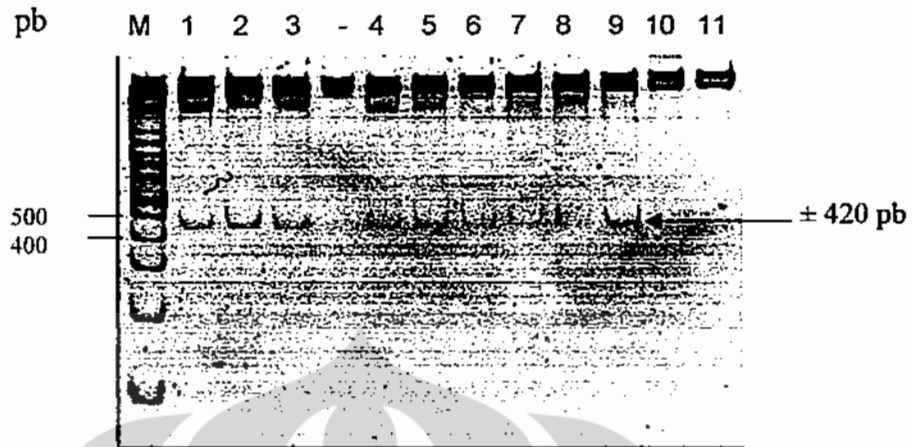


Gambar 4.11c. Analisis hasil pemotongan pcDNA3.1/HisA-IRES MLV-NA dengan enzim restriksi endonuklease EcoRV pada elektroforesis gel agarosa 0,8 %. M: marka 2 log; lajur 1, 3, 5, 7, 10: klon pcDNA3.1/HisA-IRESMLV-NA # 11-15 dipotong enzim endonuklease EcoRV (pita DNA  $\pm$  7220 pb; plasmid terpotong linier); lajur 2, 4, 6, 8, 9: klon # 11-15 yang tidak dipotong enzim restriksi endonuklease EcoRV; lajur 11: kontrol negatif ligasi (produk ligasi tidak mengandung DNA sisipan IRES MLV) dipotong enzim restriksi endonuklease EcoRV (pita DNA  $\pm$  6800 pb; plasmid terpotong linier); lajur 12: kontrol negatif ligasi yang tidak dipotong enzim EcoRV; lajur 13: kontrol plasmid rekombinan pcDNA3.1/HisA-NA#2 dipotong enzim restriksi endonuklease EcoRV (pita DNA  $\pm$  6800 pb; plasmid terpotong linier); lajur 14: kontrol plasmid rekombinan pcDNA3.1/HisA-NA#2 yang tidak dipotong enzim restriksi endonuklease EcoRV.

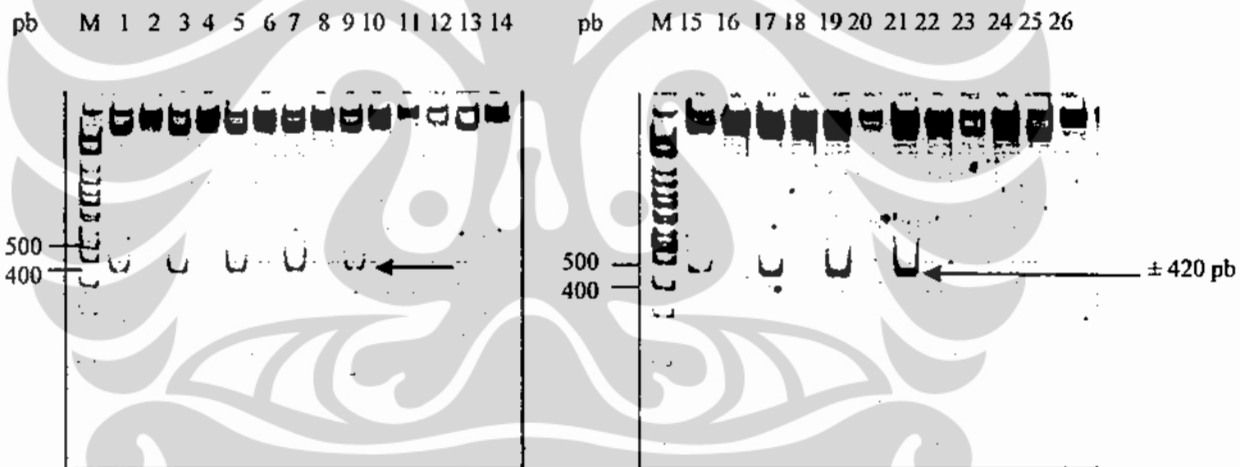


Gambar 4.11d. Analisis hasil pemotongan pcDNA3.1/HisA-IRES MLV-NA dengan enzim restriksi endonuklease EcoRV pada elektroforesis gel agarosa 0,8 %. M: marka 2 log; lajur 15, 17, 19, 21: klon pcDNA3.1/HisA-IRES MLV-NA # 16, 17, 19, 20 dipotong enzim endonuklease EcoRV (pita DNA  $\pm$  7220 pb; plasmid terpotong linier); lajur 16, 18, 20, 22: klon # 16, 17, 19, 20 yang tidak dipotong enzim restriksi endonuklease EcoRV; lajur 23: kontrol negatif ligasi (produk ligasi tidak mengandung DNA sisipan IRES MLV) dipotong enzim restriksi endonuklease EcoRV (pita DNA  $\pm$  6800 pb; plasmid terpotong linier); lajur 24: kontrol negatif ligasi yang tidak dipotong enzim EcoRV; lajur 25: kontrol plasmid rekombinan pcDNA3.1/HisA-NA#2 dipotong enzim restriksi endonuklease EcoRV (pita DNA  $\pm$  6800; plasmid terpotong linier); lajur 26: kontrol plasmid rekombinan pcDNA3.1/HisA-NA#2 yang tidak dipotong enzim restriksi endonuklease EcoRV.

Walaupun hasil pemotongan dengan enzim restriksi endonuklease EcoRV memperlihatkan bahwa klon mengandung DNA sisipan IRES MLV, yang menghasilkan pita DNA tunggal (linier) panjang lebih kurang 7220 pb, namun perlu dilakukan pemastian dengan enzim restriksi endonuklease HindIII. Hasil analisis pada gel poliakrilamid 10% (gambar 4.12a, 4.12b), menunjukkan ada DNA sisipan IRES MLV ( $\pm$  420 pb) pada klon pcDNA3.1/HisA-NA-MLV # 1-9, 11-17 dan 19-20 yang dipotong dengan enzim restriksi endonuklease HindII, sedangkan hasil analisis pada gel agarosa 1% tidak terlihat adanya DNA sisipan IRES MLV (gambar hasil analisis tidak ditampilkan). Hal ini mungkin disebabkan konsentrasi gel agarosa 1 % yang digunakan tidak dapat mendeteksi DNA fragmen IRES MLV panjang ( $\pm$  420 pb), sehingga untuk pemastian hasil pemotongan enzim restriksi di analisis pada gel poliakrilamid 10% (gambar 4.12a, 4.12b).



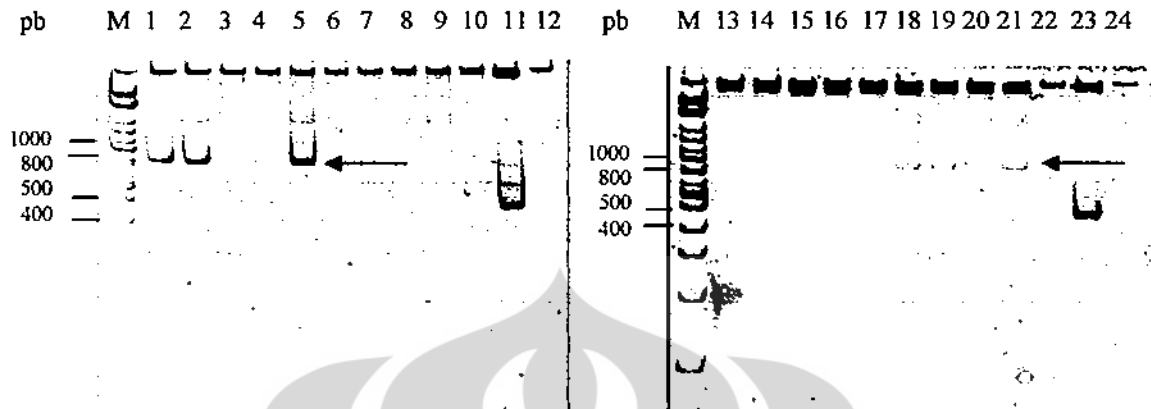
Gambar 4.12a. Analisis hasil pemotongan klon pcDNA3.1/HisA-IRES MLV-NA dengan enzim restriksi endonuklease HindIII pada elektroforesis gel poliakrilamid 10 %. M: marka 2 log; lajur 1-9: klon pcDNA3.1/HisA-IRES MLV-NA#1-9 (fragmen DNA sisipan IRES MLV ± 420 pb); lajur 10 dan 11: kontrol negatif ligasi (produk ligasi tidak mengandung DNA sisipan IRES MLV) dan kontrol positif pcDNA3.1/HisA-NA yang dipotong dengan enzim restriksi endonuklease HindIII (hasil negatif, tidak mengandung DNA sisipan IRESMLV).



Gambar 4.12b. Analisis hasil pemotongan pcDNA3.1/HisA-IRES MLV-NA dengan enzim restriksi endonuklease HindIII pada elektroforesis gel poliakrilamid 10 %. M: marka 2 log; lajur 1, 3, 5, 7, 9, 15, 17, 19, 21: klon pcDNA3.1/HisA-IRES MLV-NA # 11-17, 19-20 dipotong enzim endonuklease HindIII (tanda →: fragmen DNA sisipan IRES MLV ± 420 pb); lajur 2, 4, 6, 8, 10, 16, 18, 20, 22: klon # 11-20 yang tidak dipotong enzim restriksi endonuklease HindIII; lajur 11, 23: kontrol negatif ligasi (produk ligasi yang tidak mengandung DNA sisipan); lajur 12, 24: kontrol negatif ligasi yang tidak dipotong enzim HindIII (negatif, tidak mengandung DNA sisipan IRES MLV); lajur 13, 25: kontrol plasmid rekombinan pcDNA3.1/HisA-NA#2 dipotong enzim restriksi endonuklease EcoRV (hasil negatif, tidak mengandung DNA sisipan IRESMLV); lajur 14, 26: kontrol plasmid rekombinan pcDNA3.1/HisA-NA#2 yang tidak dipotong enzim restriksi endonuklease EcoRV.

### b) Identifikasi klon menggunakan reaksi PCR

Sisipan fragmen DNA IRES MLV yang diperlukan pada konstruksi ini terletak pada posisi 5' pada daerah hulu dari vektor pcDNA3.1/HisA-NA dengan orientasi benar (5' – 3'). Oleh karena itu, untuk identifikasi orientasi ataupun konfigurasi sisipan IRES MLV telah dilakukan dengan melalui reaksi PCR menggunakan enzim *hotstar taq polymerase*. Untuk identifikasi klon pcDNA3.1/HisA-IRES MLV-NA digunakan pasangan primer MLVF dengan N1R320 dan primer MLVR dengan N1R320. Klon pcDNA3.1/HisA-IRES MLV-NA# 1-9, 11-17 dan 19-20 digunakan sebagai cetakan DNA. Berdasarkan hasil analisis pada poliakrilamid 10% pada gambar 4.13, menunjukkan bahwa amplicon klon pcDNA3.1/HisA-IRES MLV-NA # 1, 2, 3, 5, 16, 17 dan 20 yang dihasilkan dari pasangan primer MLVF dengan N1R320 memperlihatkan pita DNA dengan panjang lebih kurang 750 pb, sedangkan amplicon klon pcDNA3.1/HisA-IRES MLV-NA # 3, 4, 6, 7, 8, 9, 11, 12, 13, 14, 15, dan 19 tidak menghasilkan pita DNA. Kontrol negatif ligasi (produk ligasi tidak mengandung DNA sisipan IRES MLV) tidak memperlihatkan pita DNA, karena tidak terdapat sisipan fragmen IRES MLV, sedangkan kontrol positif yang menggunakan pasangan primer MLVR dan MLVF dengan cetakan DNA pKS-IRES MLV# 4 menghasilkan pita DNA spesifik IRES MLV ( $\pm$  420 pb). Sebaliknya, pada gambar 4.14, amplicon klon pcDNA3.1/HisA-IRES MLV-NA # 1, 16, 17 dan 20 yang dihasilkan dari pasangan MLVR dengan N1R320 tidak terdapat pita DNA, sedangkan klon pcDNA3.1/HisA-IRESMLV-NA # 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 11, 12, 13, 14, 15, dan 19 memperlihatkan adanya pita DNA dengan panjang lebih kurang 750 pb. Dengan demikian, klon pcDNA3.1/HisA-IRESMLV-NA # 1, 16, 17 dan 20 mengandung DNA sisipan IRESMLV dengan arah orientasi benar, sesuai yang diperlukan untuk pengsubklonaan.



Gambar 4.13. Analisis klon pcDNA3.1/HisA-IRES MLV-NA dengan metode reaksi PCR *hotstar* menggunakan pasangan primer MLVF dan N1R320 untuk menentukan arah orientasi benar dan konfigurasi DNA sisipan IRES MLV pada gel poliakrilamid 10%. M: marka 2 log; lajur 1, 2, 3, 5, 18, 19, 21 (tanda  $\rightarrow$ ): klon pcDNA3.1/HisA-IRES MLV-NA# 1, 2, 3, 5, 16, 17, 20 mengandung satu fragmen DNA sisipan IRESMLV yang diduga mempunyai arah orientasi benar (arah 5' ke 3'); lajur 4, 6, 7, 8, 9, 10, 13-17, 20: klon pcDNA3.1/HisA-IRES MLV-NA# 4, 6, 7, 8, 9, 11, 12, 13, 14, 15: tidak terdapat pita DNA, maka mengandung fragmen DNA sisipan IRESMLV yang mempunyai arah orientasi terbalik (arah 3' ke 5'); lajur 10 dan 22: kontrol negatif ligasi (produk ligasi tidak mengandung DNA sisipan; tidak ada DNA sisipan IRES MLV; hasil negatif); lajur 11, 23: kontrol positif fragmen IRES MLV (fragmen IRES MLV  $\pm$  420 pb); lajur 14, 24: kontrol negatif primer dan air demineralisata (hasil negatif, tidak ada cemaran DNA).

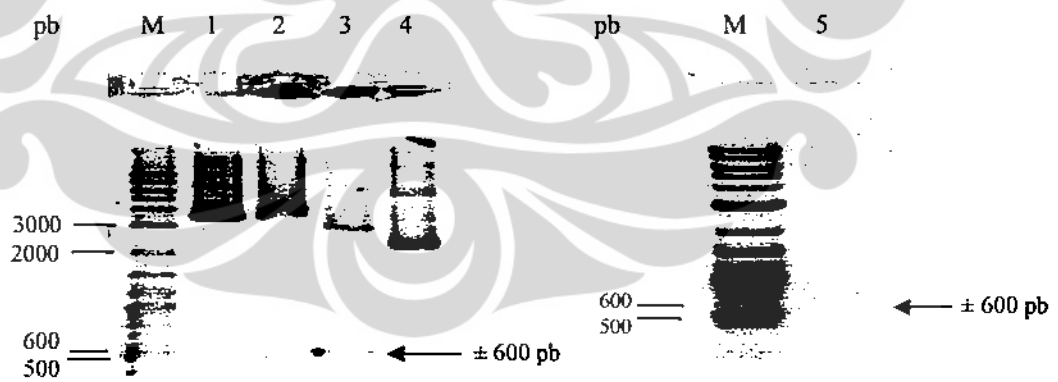


Gambar 4.14. Analisis klon pcDNA3.1/HisA-IRES MLV-NA dengan metode reaksi PCR *hotstar* menggunakan pasangan primer MLVR dan N1R320 untuk menentukan arah orientasi benar dan konfigurasi DNA sisipan IRES MLV pada gel poliakrilamid 10%. M: marka 2 log; lajur 4-11, 13-17, 20: klon pcDNA3.1/HisA-IRES MLV-NA# 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 11, 12, 13, 14, 15, 19 mengandung satu fragmen DNA sisipan IRES MLV dengan arah orientasi terbalik (arah 3' ke arah 5'); lajur 3 dan 22: kontrol negatif ligasi (negatif, tidak mengandung DNA sisipan IRES MLV); lajur 2, 24: kontrol positif fragmen IRES MLV (DNA sisipan fragmen IRESMLV  $\pm$  420 pb); lajur 1, 23: kontrol negatif primer dan air demineralisata (negatif, tidak ada cemaran DNA); lajur 12, 18, 19, 21 (tanda  $\rightarrow$ ): klon pcDNA3.1/HisA-IRESMLV-NA # 1, 16, 17 dan 20 tidak menghasilkan pita DNA, maka klon mengandung DNA sisipan fragmen IRESMLV dengan orientasi benar.

### 4.1.3 Pengsubklonaan IRES HIV-bsf# 1 ke dalam pcDNA3.1/HisA-NA-MLV# 1 pada situs NotI - EcoRV

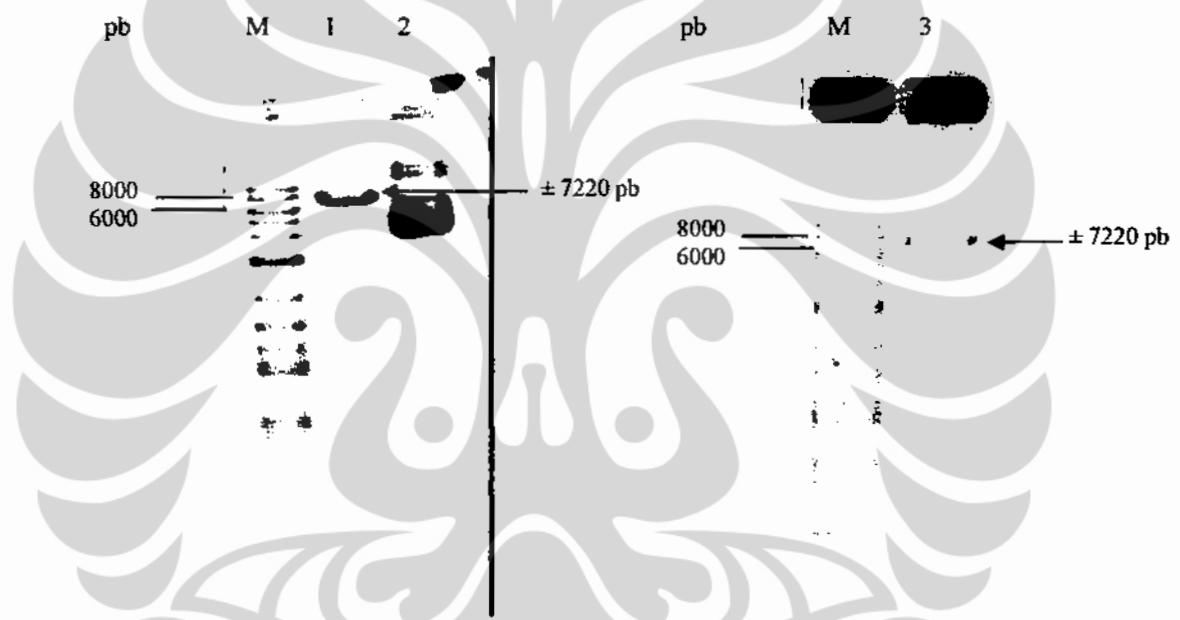
#### 4.1.3.1 Pemotongan plasmid rekombinan

Fragmen IRES HIV-bsf dihasilkan dari pemotongan plasmid rekombinan pKS-IRES HIV-bsf # 1 dengan enzim restriksi endonuklease XhoI dan NotI, berbentuk *sticky end*. Sebaliknya, hasil pemotongan vektor pcDNA3.1/HisA-NA-MLV# 1 dengan enzim restriksi endonuklease NotI membentuk *sticky end* dan EcoRV *blunt end*. Untuk mendapatkan fragmen IRES HIV-bsf-XhoI-NotI berbentuk *blunt end* dan *sticky end*, maka setelah pemotongan pKS-IRES HIV-bsf dengan enzim restriksi endonuklease XhoI dibentuk *blunt end* dengan metode *blunt polish end* melalui reaksi PCR. Pemotongan pKS-IRES HIV-XhoI-*blunt* dilanjutkan dengan enzim restriksi endonuklease NotI menghasilkan pita DNA vektor (2851 pb) dan fragmen DNA sisipan IRES HIV-bsf ( $\pm 600$  pb). Sisipan fragmen DNA IRES HIV-bsf berhasil diperoleh melalui isolasi gel LMA 1 % mengandung ungu kristal 1,6  $\mu\text{g}/\text{mL}$  untuk pewarnaan DNA. Gambar 4.15 memperlihatkan hasil pemotongan pKS-IRES HIV-bsf # 1 dengan enzim restriksi endonuklease XhoI dan NotI dan analisis hasil isolasi gel QG-IRES HIV-bsf-*blunt*-NotI pada gel agarosa 1 %.



Gambar 4.15. Analisis hasil pemotongan plasmid rekombinan pKS-IRESHIV-bsf # 1 dengan enzim restriksi endonuklease XhoI dan NotI pada elektroforesis gel agarosa 1 %. M: marka 2 log; lajur 1: produk purifikasi pKS-IRES HIV-bsf-XhoI; lajur 2: produk pKS-IRES HIV-bsf-XhoI (p)-*blunt*; lajur 3: tanda  $\rightarrow$ : fragmen IRES HIV-bsf *blunt*-NotI ( $\pm 600$  pb); lajur 4: pKS-IRES HIV-bsf # 1 yang tidak dipotong dengan enzim restriksi; lajur 5: tanda  $\rightarrow$  : QG-IRES HIV-bsf ( $\pm 600$  pb).

Vektor pcDNA3.1/HisA-IRES MLV-NA# 1 sebagai vektor untuk pengsubklonasi fragmen IRES HIV-bsf dipotong dengan enzim restriksi endonuklease pada situs NotI dan EcoRV, dimana vektor berhasil diperoleh melalui isolasi gel LMA 0,8% dengan pewarnaan DNA menggunakan ungu kristal 1,6 µg/mL. Hasil pemotongan vektor pcDNA3.1/HisA-IRES MLV-NA #1 dengan enzim restriksi endonuklease Not I dan EcoRV dianalisis menggunakan elektrofesis gel agarosa 0,8% yang menghasilkan pita DNA tunggal (linier) lebih kurang 7220 pb dan hasil isolasi dari gel LMA dengan ukuran yang sama ( $\pm 7220$  pb) pada gambar 4.16.

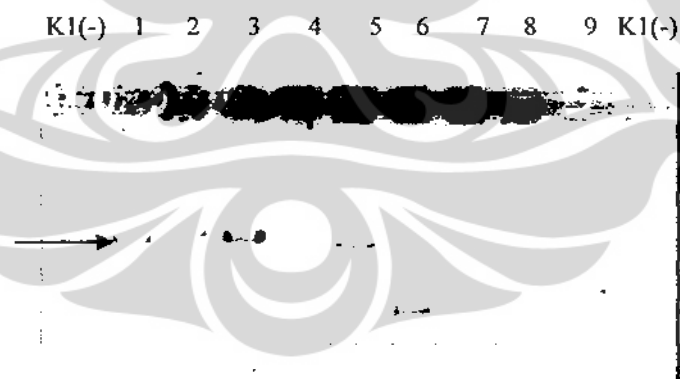


Gambar 4.16. Analisis hasil pemotongan vektor pcDNA3.1/HisA-IRES MLV-NA # 1 dengan enzim restriksi endonuklease NotI dan EcoRV pada elektrofesis gel agarosa 0,8 %; M: marka 2 log; lajur 1: tanda  $\rightarrow$  : pcDNA3.1/HisA-IRES MLV-NA# 1-NotI(p)-EcoRV; lajur 2: pcDNA3.1/HisA-IRES MLV-NA# 1 yang tidak dipotong enzim restriksi endonuklease; lajur 3: tanda  $\rightarrow$  : QG-pcDNA3.1/HisA-IRESMLV-NA# 1-NotI (p)-EcoRV ( $\pm 7220$  pb).

#### 4.1.3.2 Transformasi hasil ligasi

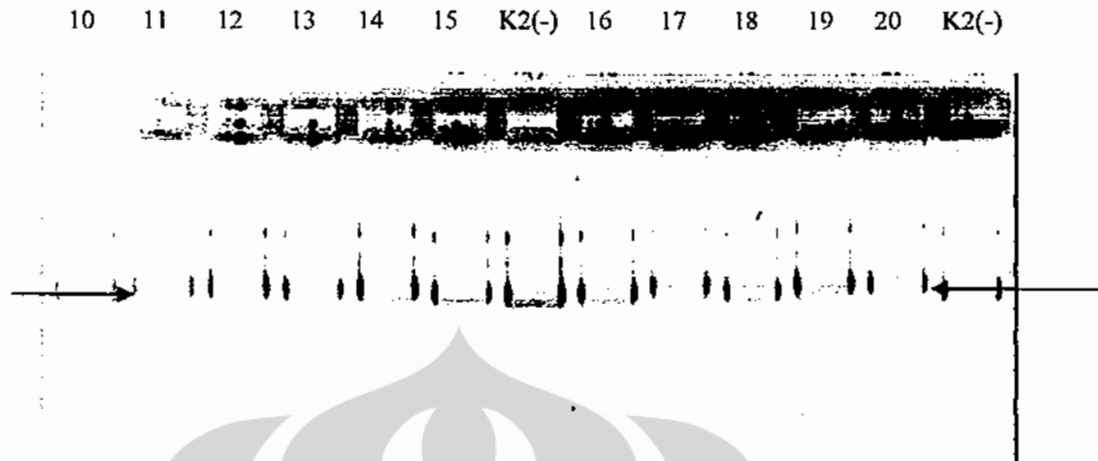
Transformasi produk ligasi pcDNA3.1/HisA-IRES MLV-NA #1-NotI-EcoRV dan fragmen IRES HIV-bsf-blunt-NotI dilakukan 2 kali transformasi menggunakan produk ligasi yang sama. Hasil dari 2 kali transformasi produk ligasi menghasilkan 9 dan 16 klon tumbuh pada LB agar, sedangkan koloni yang

tumbuh dari kontrol negatif ligasi (produk ligasi yang tidak mengandung DNA sisipan) berjumlah 1 klon dan 10 klon. Kontrol positif untuk melihat kompetensi sel *E. coli* TOP 10 yang menggunakan plasmid pCDNA5/FRT menghasilkan lebih kurang 1000 koloni dan pcDNA3.1/HisA menghasilkan sejumlah lebih kurang 300 koloni. Kontrol negatif sel kompeten *E. coli* TOP 10 memperlihatkan tidak ada pertumbuhan koloni, dengan demikian sel *E. coli* yang digunakan bebas dari kontaminasi, juga menunjukkan bahwa sel *E. coli* resisten terhadap antibiotik ampisilin pada konsentrasi 50 µg/mL. Untuk mengetahui adanya sisipan fragmen IRES HIV-bsf pada vektor pcDNA3.1/HisA-IRES MLV-NA, dari 25 klon yang tumbuh dipilih secara acak sejumlah 20 klon hasil ligasi dan 2 klon dari kontrol negatif ligasi. Klon yang dipilih kemudian diinokulasi ke dalam media LB cair dan LB agar. Gambar 4.17a dan 4.17b menunjukkan analisis hasil isolasi klon pada gel agarosa 0,8%, dimana terlihat ada perbedaan pola migrasi DNA plasmid sirkuler antara plasmid rekombinan pcDNA3.1/HisA-IRES MLV-NA-IRES HIV-bsf dengan klon pcDNA3.1/HisA-IRES MLV-NA yang berasal dari kontrol negatif ligasi, yaitu klon nomor 1, 2, 3, 4 dan 9. Perbedaan pola migrasi DNA plasmid sirkuler menunjukkan plasmid rekombinan diduga mengandung DNA sisipan fragmen IRES HIV-bsf ( $\pm 600$  pb).



Gambar 4.17a. Identifikasi plasmid mengandung DNA sisipan pada koloni *E. coli* nomor 1-9 hasil transformasi produk ligasi pcDNA3.1/HisA-IRES MLV-NA dengan sisipan IRES HIV-bsf, berdasarkan perbedaan pola migrasi DNA plasmid sirkuler pada elektroforesis gel agarosa 0,8%. Tanda  $\rightarrow$ : klon no. 1, 2, 3, 4, 5 dan 9 diduga mengandung DNA sisipan IRES HIV-bsf; K1(-): kontrol negatif ligasi (produk ligasi yang tidak mengandung DNA sisipan).



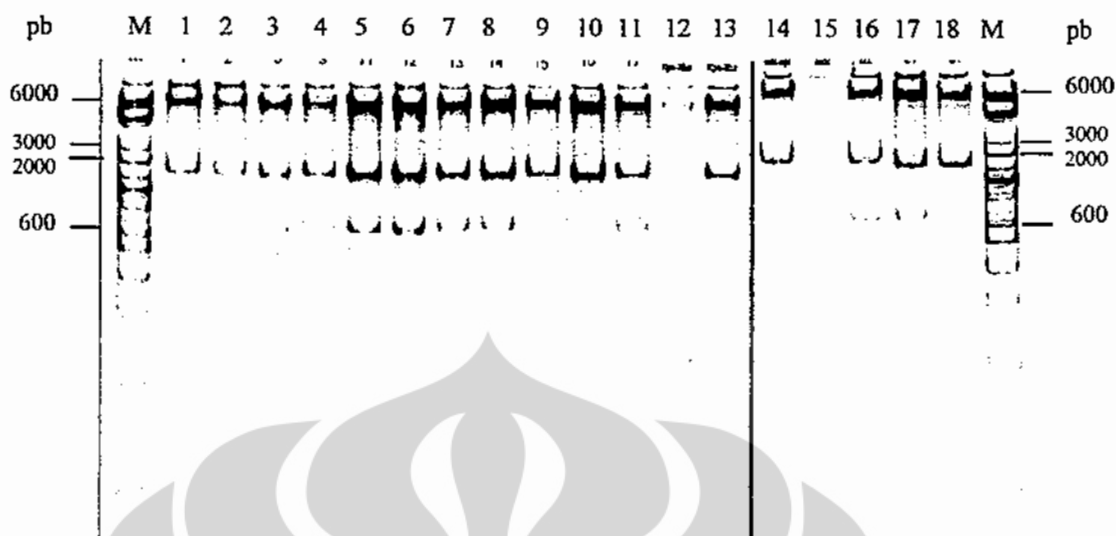


Gambar 4.17b. Identifikasi plasmid mengandung DNA sisipan pada koloni *E.coli* nomor 10-20 hasil transformasi produk ligasi pcDNA3.1/HisA-IRES MLV-NA dengan sisipan IRESHIV-bsf, berdasarkan perbedaan pola migrasi DNA plasmid sirkuler pada elektroforesis gel agarosa 0,8%. Tanda  $\rightarrow$ : klon no. 11, 12, 13, 14, 16, 17, 18, 19 dan 20 diduga mengandung DNA sisipan IRESHIV-bsf, K2(-): kontrol negatif ligasi (produk ligasi yang tidak mengandung DNA sisipan).

#### 4.1.3.3 Identifikasi klon pcDNA3.1/HisA-IRES MLV-NA-IRES HIV-bsf

##### a) Identifikasi klon menggunakan enzim restriksi endonuklease

Identifikasi klon pcDNA3.1/HisA-IRES MLV-NA-IRES HIV-bsf # 1, 2, 3, 4, 9, 11, 12, 13, 14, 16, 17, 18, 19 dan 20 yang dipotong enzim restriksi endonuklease KpnI dan Xba mengandung sisipan fragmen IRES HIV-bsf, pada gel poliakrilamid 12 % (gambar 4.18). Berdasarkan hasil analisis, terlihat ada tiga pita DNA, yaitu fragmen DNA berukuran ( $\pm$  5760 pb), DNA sisipan fragmen NA ( $\pm$  1340 pb) dan fragmen IRES HIV-bsf ( $\pm$  600 pb) pada klon pcDNA3.1/HisA-IRES MLV-NA-IRES HIV-bsf # 2, 3, 9, 11, 13, 14, 17, 19 dan 20. Klon yang berasal dari kontrol negatif ligasi (produk ligasi yang tidak mengandung DNA sisipan IRES HIV-bsf) dan vektor pcDNA3.1/HisA-IRES MLV-NA yang dipotong enzim KpnI dan Xba hanya menghasilkan dua pita DNA, yaitu fragmen DNA ( $\pm$  5760 pb) dan DNA sisipan fragmen NA ( $\pm$  1340 pb), demikian juga klon pcDNA3.1/HisA-IRESMLV-NA-IRESHIV-bsf # 1, 15, 16 dan 18. Hal ini menunjukkan bahwa klon pcDNA3.1/HisA-IRESMLV-NA-IRESHIV-bsf # 1, 15, 16 dan 18 tidak mengandung DNA sisipan fragmen IRESHIV-bsf.

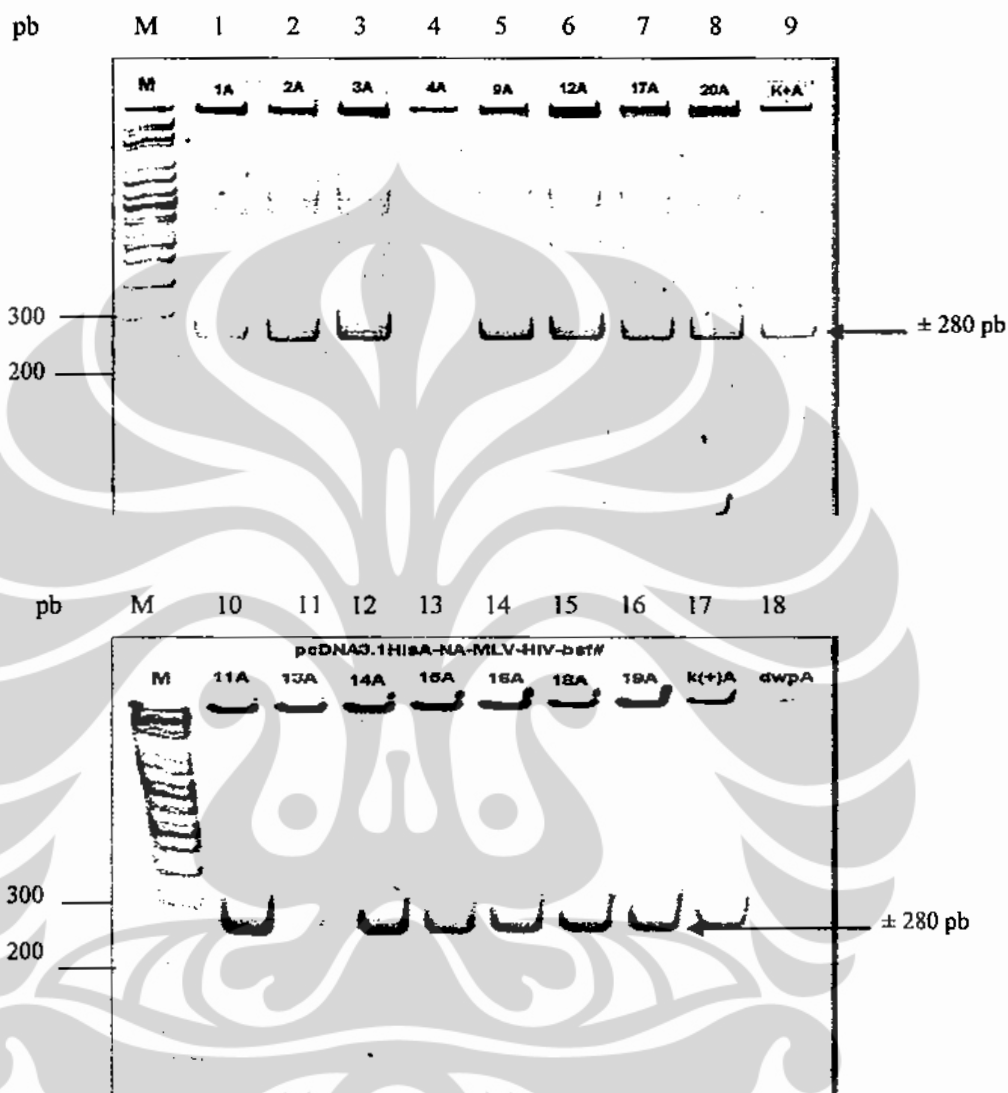


Gambar 4.18. Analisis hasil pemotongan pcDNA3.1/HisA-IRES MLV-NA-IRES HIV-bsf dengan enzim restriksi endonuklease KpnI dan Xba pada elektroforesis gel poliakrilamid 12 %. M: marka 2 log; lajur 2-8, 11, 16 dan 17: klon pcDNA3.1/HisA-IRES MLV-NA-IRES HIV-bsf # 2, 3, 9, 11, 12, 13, 14, 17, 20 dan 19 dipotong enzim KpnI dan Xba menghasilkan 3 pita DNA (fragmen  $\pm$  5760 pb;  $\pm$  1340 pb dan  $\pm$  600 pb), jadi klon mengandung DNA sisipan fragmen IRES HIV-bsf  $\pm$  600 pb; lajur 1, 9, 10, 18: klon pcDNA3.1/HisA-IRES MLV-NA-IRES HIV-bsf # 1, 15, 16, 18 dipotong enzim KpnI dan Xba menghasilkan 2 pita DNA (fragmen  $\pm$  5760 pb dan  $\pm$  1340 pb), jadi klon tidak mengandung DNA sisipan fragmen IRES HIV-bsf; lajur 12, 15: kontrol negatif ligasi (produk ligasi yang tidak mengandung DNA sisipan IRES HIV-bsf) dipotong enzim KpnI dan Xba menghasilkan 2 pita DNA (fragmen  $\pm$  5760 pb dan  $\pm$  1340 pb); lajur 13, 14: kontrol negatif vektor pcDNA3.1/HisA-IRES MLV-NA# 1 dipotong enzim KpnI dan Xba menghasilkan 2 pita DNA (fragmen  $\pm$  5760 pb dan  $\pm$  1340 pb).

### b) Identifikasi klon menggunakan reaksi PCR

Identifikasi klon dilakukan melalui reaksi PCR *hotstar* menggunakan pasangan primer HIVF dan HIVR (primer A) dan pasangan BSFF dan primer HIVR (primer B) dengan cetakan DNA, yaitu klon pcDNA3.1/HisA-IRES MLV-NA-IRES HIV-bsf yang diduga mengandung DNA sisipan fragmen IRES HIV-bsf ditampilkan pada gambar 4.19 dan 4.20. Berdasarkan hasil analisis pada gel poliakrilamid 12% terhadap klon dengan primer A (gambar 4.19) menunjukkan bahwa klon pcDNA3.1/HisA-IRES MLV-NA-IRES HIV-bsf # 1, 2, 3, 9, 11, 12, 14, 15, 16, 17, 18, 19, dan 20 terdapat fragmen IRES HIV-bsf, sedang klon # 4 dan 13 tidak mengandung fragmen IRES HIV-bsf. Kontrol positif IRES HIV menggunakan primer A dengan cetakan DNA pKS-IRES HIV# 2 menghasilkan fragmen IRES HIV ( $\pm$  280 pb). Hasil analisis juga memperlihatkan kontrol negatif

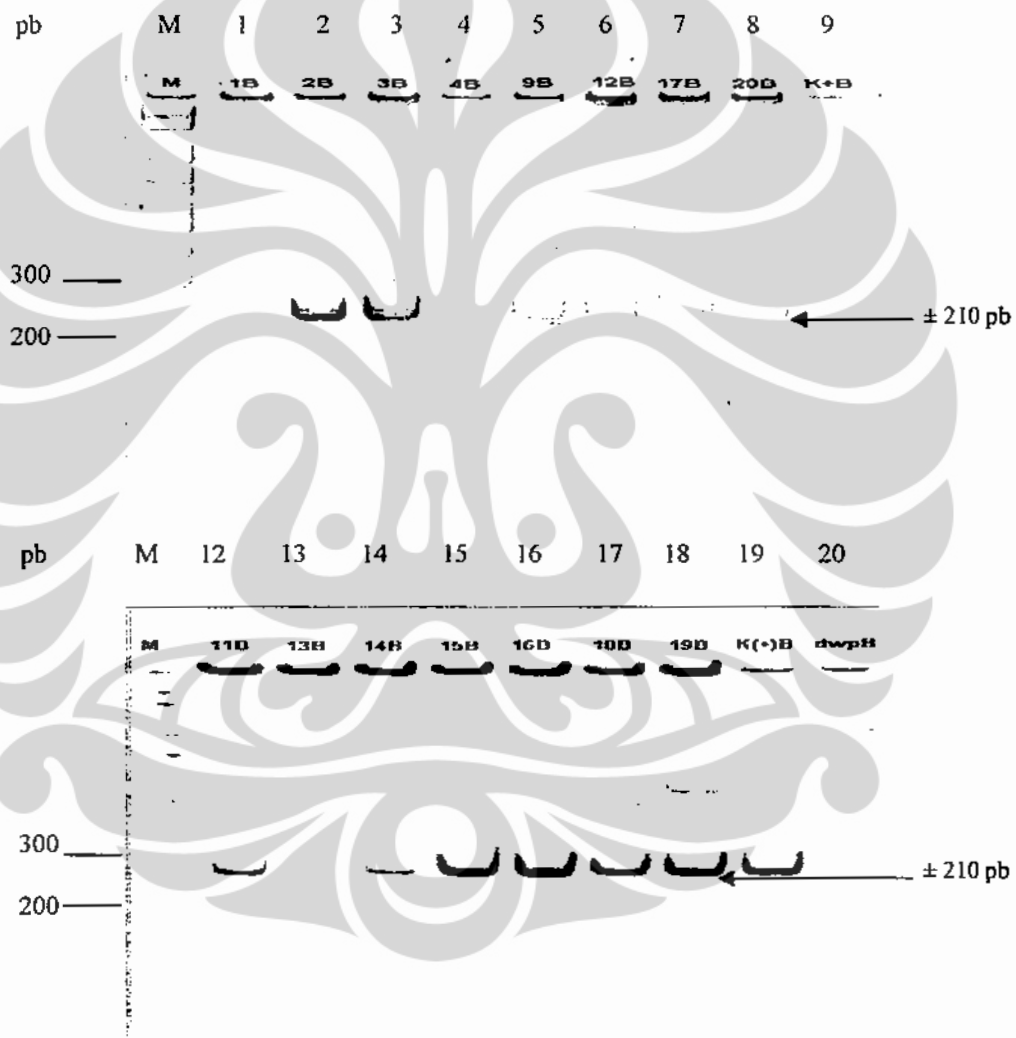
primer A dan air demineralisata yang dipakai untuk reaksi PCR tidak terdapat pita DNA.



Gambar 4.19. Analisis klon pcDNA3.1/HisA-IRES MLV-NA-IRES HIV-bsf dengan metode reaksi PCR *hotstar* menggunakan pasangan primer HIVF dan HIVR untuk identifikasi DNA sisipan fragmen IRES HIV-bsf pada elektroforesis gel poliakrilamid 12 %. M: marka 2 log; lajur 1-3, 5-8, 10, 12-17: klon pcDNA3.1/HisA-IRES MLV-NA-IRES HIV-bsf # 1, 2, 3, 9, 12, 17, 20, 11, 14, 15, 16, 18, 19 mengandung fragmen IRES HIV-bsf, karena amplicon yang dihasilkan dari pasangan primer HIVF dan HIVR memperlihatkan ada fragmen IRES HIV ( $\pm 280$  pb); lajur 9 dan 17: kontrol positif fragmen IRES HIV ( $\pm 280$  pb); lajur 18: kontrol negatif menggunakan pasangan primer HIVF-HIVR dan air demineralisata menunjukkan tidak ada kontaminasi DNA. Tanda  $\rightarrow$  : posisi klon mengandung fragmen IRES HIV-bsf ( $\pm 280$  pb).

Reaksi PCR menggunakan primer B dengan cetakan DNA fragmen BSF memperlihatkan bahwa klon pcDNA3.1/HisA-IRES MLV-NA-IRES HIV-bsf #

2, 3, 9, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, dan 20 mengandung fragmen BSF dan kontrol positif fragmen BSF menggunakan primer B dengan cetakan DNA produk BSF memberikan hasil positif (gambar 4.20). Berdasarkan hasil identifikasi klon menggunakan enzim restriksi endonuklease dan reaksi PCR *hotstar* diketahui bahwa klon yang positif mengandung fragmen IRES HIV-bsf adalah klon pcDNA3.1/HisA-IRES MLV-NA-IRES HIV-bsf # 2, 3, 9, 11, 12, 14, 15, 16, 17, 19, dan 20.

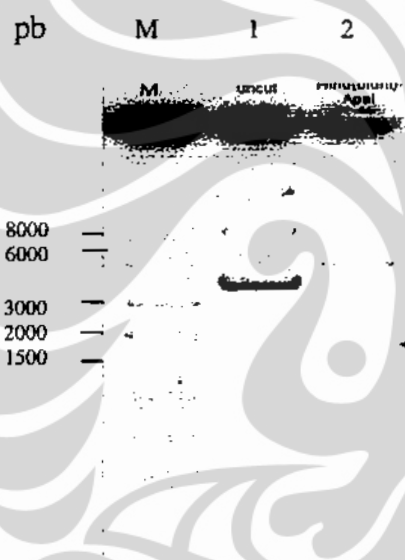


Gambar 4.20. Analisis klon pcDNA3.1/HisA-IRES MLV-NA-IRES HIV-bsf dengan metode reaksi PCR *hotstar* menggunakan pasangan primer BSFF dan HIVR untuk identifikasi DNA sisipan fragmen IRES HIV-bsf pada elektroforesis gel poliakrilamid 12 %. M: marka 2 log; lajur 2-8, 12-18: klon pcDNA3.1/HisA-IRES MLV-NA-IRES HIV-bsf # 2, 3, 4, 9, 12, 17, 20, 11, 13, 14, 15, 16, 18, 19 mengandung fragmen IRESHIV-bsf, karena amplicon yang dihasilkan dari pasangan primer BSFF dan HIVR memperlihatkan ada fragmen BSF ( $\pm 210$  pb); lajur 9 dan 19: kontrol positif fragmen bsf ( $\pm 210$  pb); lajur 20: kontrol negatif pasangan primer BSFF dan HIVR air demineralisata, menunjukkan tidak ada kontaminasi DNA.

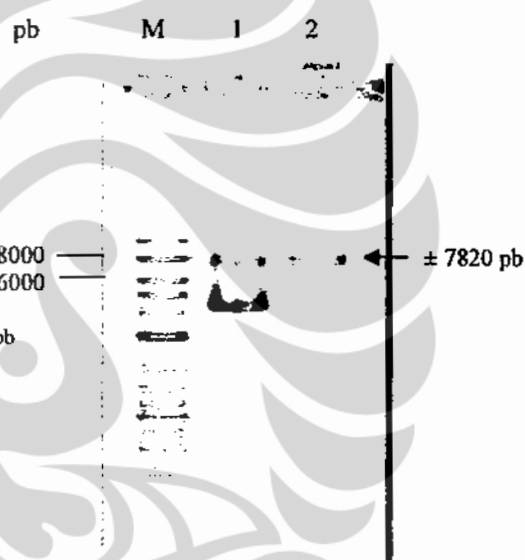
#### 4.1.4 Pengsubklonaaan fragmen HA ke dalam pcDNA3.1/HisA-IRES MLV-NA-IRES HIV-bsf pada situs XbaI-ApaI

##### 4.1.4.1 Pemotongan plasmid rekombinan

Pemotongan plasmid rekombinan pcDNA5/FRT pada situs HindIII-*blunt* dan ApaI untuk mengeluarkan fragmen HA ( $\pm 1700$  pb). Hasil pemotongan dan purifikasi plasmid rekombinan dianalisis pada gel agarosa 0,8 % memperlihatkan fragmen HA dengan panjang lebih kurang 1700 pb (gambar 4.21). Untuk pengsubklonaaan fragmen HA, vektor pcDNA3.1/HisA-IRES MLV-NA-IRES HIV-bsf berhasil dipotong dengan enzim restriksi endonuklease pada situs XbaI (*blunt*)-ApaI dengan panjang kurang lebih 7820 pb. (gambar 4.22).

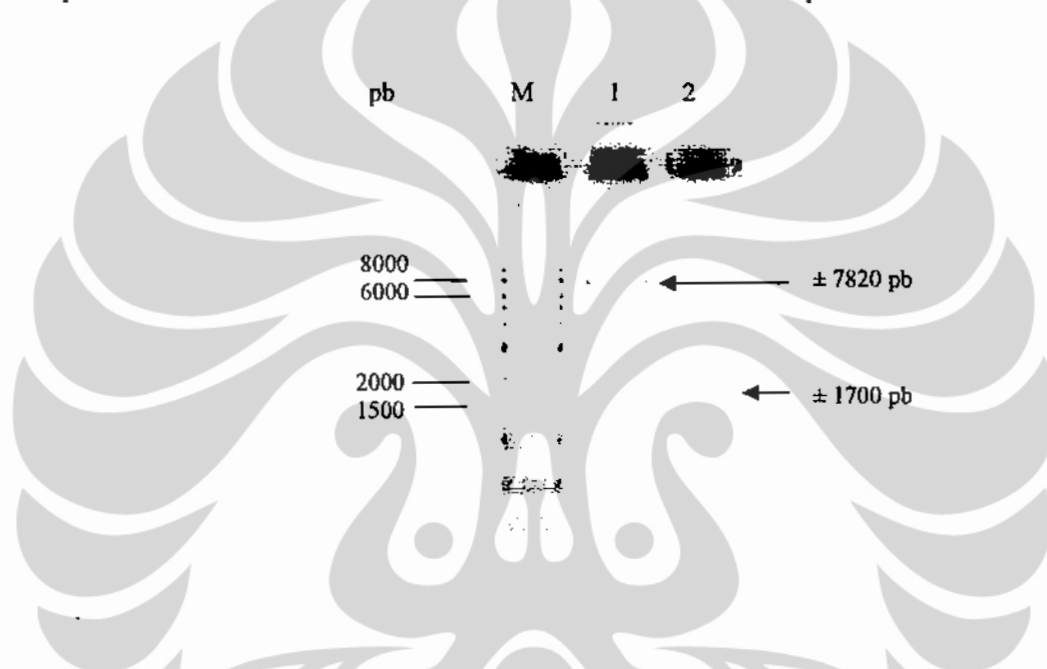


Gambar 4.21. Analisis hasil pemotongan pcDNA5/FRT-HA-sc#10 dengan enzim restriksi endonuklease HindIII (*blunt*)-ApaI pada elektroforesis gel agarosa 0,8 %. M: marka 2 log; lajur 1: pcDNA5/FRT-HA-sc#10 tidak dipotong enzim; lajur 2: pcDNA5/FRT-HA-sc#10 dipotong enzim HindIII (*blunt*)-ApaI untuk memperoleh DNA sisipan fragmen HA  $\pm 1700$  pb.



Gambar 4.22. Analisis hasil pemotongan pcDNA3.1/HisA-IRESMLV-NA-IRESHIV-bsf #17 dengan enzim restriksi endonuklease Xba (*blunt*)-ApaI pada elektroforesis gel agarosa 0,8%. M: marka 2 log; lajur 1: pcDNA3.1/HisA-IRESMLV-NA-IRESHIV-bsf# 17 tidak dipotong enzim; lajur 2: pcDNA3.1/HisA-IRESMLV-NA-IRESHIV-bsf dipotong enzim Xba (*blunt*)-ApaI untuk memperoleh DNA vektor  $\pm 7820$  pb.

Analisis plasmid rekombinan pcDNA5/FRT-HAsc# 10-HindIII(*blunt*)-ApaI dan vektor pcDNA3.1/HisA-IRES MLV-NA-IRES HIV-bsf # 17-XbaI(*blunt*)-ApaI diisolasi dari gel LMA 0,8 % mengandung ungu kristal untuk pewarnaan DNA telah berhasil dilakukan, dimana pada gel terlihat pita DNA fragmen HA *blunt*-ApaI ( $\pm 1700$  pb) dan vektor pcDNA3.1/HisA-IRES MLV-NA-IRES HIV-bsf# 17-*blunt*-ApaI ( $\pm 7820$  pb) berwarna ungu (gambar 4.23). Hasil isolasi gel fragmen HA disebut QG-HA-*blunt*-ApaI dan vektor sebagai QG-pcDNA3.1/HisA-IRESMLV-NA -IRESHIV-bsf- *blunt*-ApaI

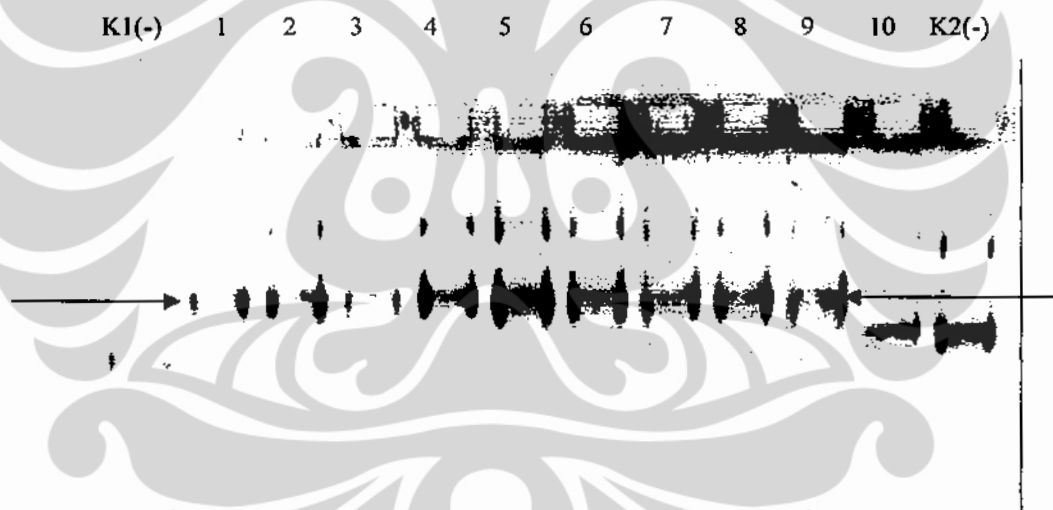


Gambar 4.23. Identifikasi fragmen yang diisolasi dari gel LMA pada elektroforesis gel agarosa 0,8 %. M: marka 2 log; lajur 1: QG-pcDNA3.1/His A-IRESMLV-NA-IRESHIV-bsf-*blunt*-ApaI ( $\pm 7820$  pb); lajur 2: QG-HA-*blunt*- ApaI ( $\pm 1700$  pb). Tanda  $\rightarrow$  : QG-pcDNA3.1/HisA-IRESMLV-NA-IRESHIV-bsf-*blunt*-ApaI dan QG-HA-*blunt*-ApaI.

#### 4.1.4.2 Transformasi hasil ligasi

Hasil transformasi produk ligasi QG-HA-*blunt*-ApaI dengan QG-pcDNA3.1/HisA-IRESMLV-NA-IRESHIV-bsf-*blunt*-ApaI menghasilkan sejumlah 232 klon tumbuh pada LB agar, sedangkan koloni yang tumbuh dari kontrol negatif ligasi (produk ligasi yang tidak mengandung DNA sisipan IIA) berjumlah 63 klon dan kontrol positif untuk melihat kompetensi sel *E. coli* TOP 10 yang menggunakan plasmid pcDNA5/FRT menghasilkan sejumlah lebih kurang 500 koloni. Kontrol negatif sel kompeten *E. coli* T.10 memperlihatkan tidak ada

pertumbuhan koloni, dengan demikian sel *E. coli* yang digunakan bebas dari kontaminasi, selain itu memperlihatkan bahwa sel *E. coli* resisten terhadap antibiotik ampisilin pada konsentrasi 50 µg/mL. Untuk mengetahui adanya sisipan fragmen HA pada vektor pcDNA3.1/HisA-IRES MLV-NA-IRES HIV-bsf, dari 232 klon yang tumbuh dipilih secara acak sejumlah 10 klon hasil ligasi dan 2 klon dari kontrol negatif ligasi. Kemudian klon yang dipilih, diinokulasi ke dalam media LB cair dan LB agar. Gambar 4.24 menunjukkan analisis hasil isolasi klon pada gel agarosa 0,8 %, dimana terlihat ada perbedaan pola migrasi DNA plasmid sirkuler antara plasmid rekombinan pcDNA3.1/HisA-IRES MLV-NA-IRES HIV-bsf-HA dengan klon pcDNA3.1/HisA-IRES MLV-NA-IRES HIV-bsf yang berasal dari kontrol negatif ligasi, yaitu klon nomor 1- 9. Perbedaan pola migrasi DNA plasmid sirkuler menunjukkan plasmid rekombinan diduga mengandung DNA sisipan fragmen HA ( $\pm 1700$  pb).



Gambar 4.24 Identifikasi plasmid mengandung DNA sisipan pada koloni *E.coli* nomor 1-10 hasil transformasi produk ligasi pcDNA3.1/HisA-IRESMLV-NA-IRESHIV-bsf dengan sisipan fragmen HA, berdasarkan perbedaan pola migrasi DNA plasmid sirkuler pada elektroforesis gel agarosa 0,8%. Tanda  $\rightarrow$ : klon no. 1-9 diduga mengandung DNA sisipan BSF; K1(-) dan K2(-): kontrol negatif ligasi (produk ligasi yang tidak mengandung DNA sisipan HA).

#### 4.1.4.3 Identifikasi klon pcDNA3.1/HisA-IRESMLV-NA-IRESHIV-bsf-HA

Identifikasi klon pcDNA3.1/HisA-IRES MLV-NA-IRES HIV-bsf-HA yang diduga mengandung fragmen DNA sisipan dipotong dengan enzim restriksi

endonuklease ApaI dan Xba. Selanjutnya, klon yang mengandung fragmen-fragmen IRES MLV, NA, BSF, IRES HIV dan HA dianalisis dengan teknik *sequencing*.

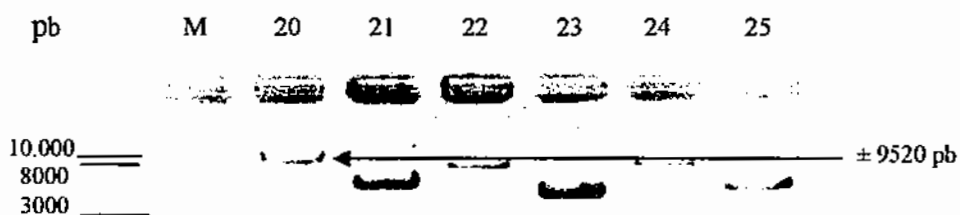
#### a) Identifikasi klon menggunakan enzim restriksi endonuklease

Identifikasi klon pcDNA3.1/HisA-IRES MLV-NA-IRES HIV-bsf-HA # 1-9 yang dipotong enzim restriksi endonuklease ApaI dan dianalisis pada gel agarosa 0,8 % (gambar 4.25a dan 4.25b). Berdasarkan hasil analisis, terlihat bentuk linierisasi plasmid rekombinan berupa pita DNA tunggal dengan panjang lebih kurang 9520 pb, sesuai dengan ukuran panjang DNA yang diharapkan.



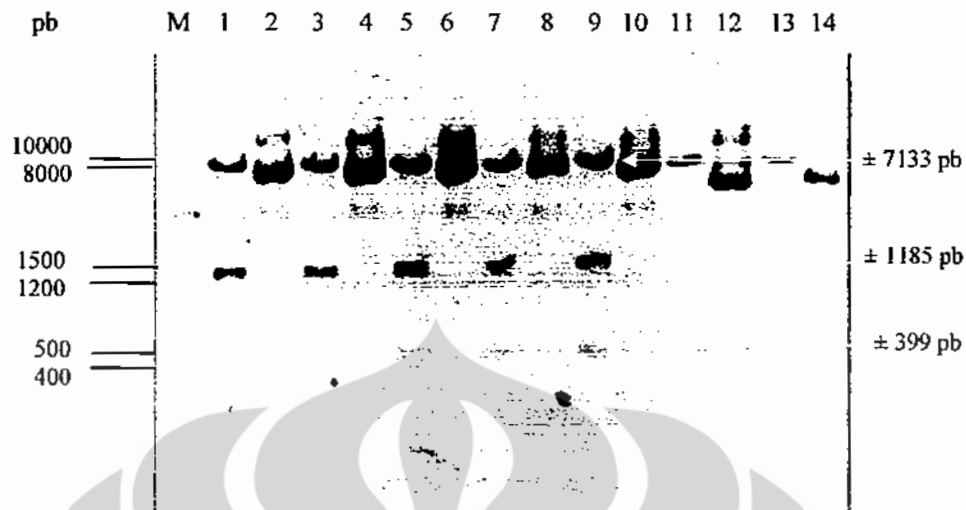
Gambar 4.25a. Analisis hasil pemotongan klon pcDNA3.1/His A-IRES MLV-NA-IRES HIV-bsf-HA dengan enzim restriksi endonuklease ApaI pada elektroforesis gel agarosa 0,8 %. M: marka 2 log; lajur 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15: klon pcDNA3.1/HisA-IRES MLV-NA-IRES HIV-bsf-HA # 1-8 dipotong enzim ApaI menghasilkan pita DNA tunggal (linier) ± 9520 pb (tanda →); lajur 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16: klon pcDNA3.1/HisA-IRES MLV-NA-IRES HIV-bsf-HA # 1-8 tidak dipotong enzim ApaI; lajur 17: kontrol negatif ligasi (produk ligasi tidak mengandung DNA sisipan HA) yang dipotong dengan enzim ApaI menghasilkan pita DNA tunggal (linier) ± 7820 pb; dan lajur 18: pcDNA3.1/HisA-IRES MLV-NA-bsf-IRES HIV tidak dipotong dengan enzim ApaI; lajur 19: pcDNA3.1/HisA-IRES MLV-NA-bsf-IRES HIV(wt) dipotong enzim ApaI menghasilkan pita DNA tunggal (linier) ± 7820 pb.



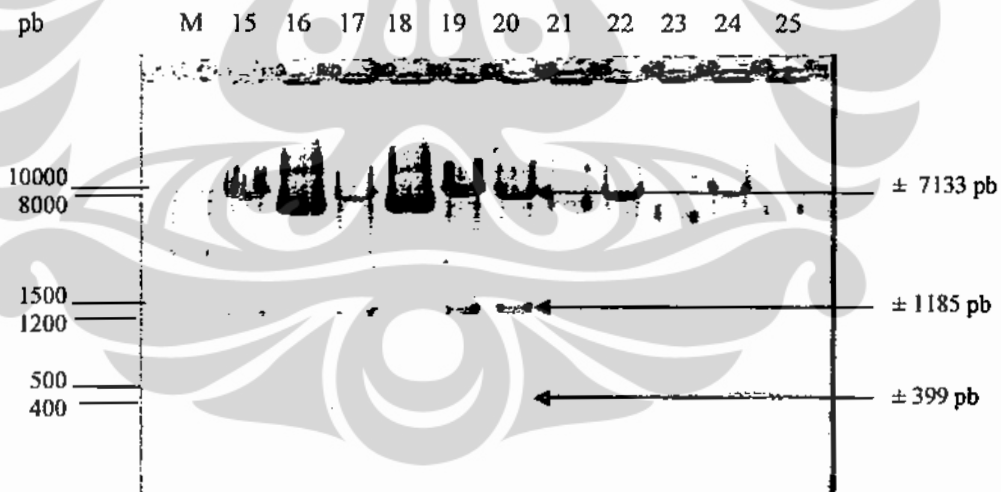


Gambar 4.25b. Analisis hasil pemotongan klon pcDNA3.1/His A-IRES MLV-NA-IRES HIV-bsf-HA dengan enzim restriksi endonuklease ApaI pada elektroforesis gel agarosa 0,8 %. M: marka 2 log; **lajur 20:** klon pcDNA3.1/HisA-IRES MLV-NA-IRES HIV-bsf-HA # 9 dipotong enzim ApaI menghasilkan pita DNA tunggal (linier)  $\pm 9520$  pb; **lajur 21:** klon pcDNA3.1/HisA-IRES MLV-NA-IRES HIV-bsf-HA # 9 tidak dipotong enzim ApaI; **lajur 22:** kontrol negatif ligasi ligasi (produk ligasi tidak mengandung DNA sisipan HA) dipotong dengan enzim ApaI menghasilkan pita DNA tunggal (linier)  $\pm 7820$  pb; **lajur 23:** kontrol negatif ligasi tidak dipotong enzim ApaI; **lajur 24:** dan pcDNA3.1/HisA-IRES MLV-NA-bsf-IRES HIV (wt) dipotong enzim ApaI menghasilkan pita DNA tunggal (linier)  $\pm 7820$  pb; **lajur 25:** wt tidak dipotong enzim ApaI.

Selain analisis melihat linierisasi klon, dilakukan juga pemotongan menggunakan enzim restriksi endonuklease Xba untuk pemastian DNA sisipan fragmen HA, karena pada fragmen HA terdapat 3 situs restriksi Xba dan satu situs restriksi pada vektor. Hasil pemotongan dengan enzim restriksi ditampilkan pada gambar 4.26a. dan 4.26b., hanya terlihat tiga pita DNA klon pcDNA3.1/HisA-IRES MLV-NA-IRES HIV-bsf-HA # 1-9, yaitu pita DNA berukuran lebih kurang 7133 pb, 1185 pb dan 399 pb. Pita DNA dengan ukuran ( $\pm 864$  pb) tidak terlihat pada gel elektroforesis, kemungkinan karena berhimpitan dengan pita DNA panjang  $\pm 1185$  pb. Berdasarkan hasil analisis dengan menggunakan enzim ApaI maupun Xba, dapat ditunjukkan bahwa semua klon pcDNA3.1/HisA-IRES MLV-NA-bsf-IRES HIV-HA mengandung DNA sisipan fragmen HA ( $\pm 1700$  pb).



Gambar 4.26a. Analisis hasil pemotongan klon dengan enzim restriksi endonuklease Xba pada gel agarosa 1 %. M: marka 2 log; lajur 1, 3, 5, 7, 9: klon pcDNA3.1/HisA-IRES MLV-NA- bsf-IRES HIV-HA # 1 - 5 dipotong enzim Xba menghasilkan 3 pita DNA (fragmen DNA  $\pm$  7133 pb; fragmen  $\pm$  1185 pb dan fragmen  $\pm$  399 pb); lajur 2, 4, 6, 8, 10: klon pcDNA3.1/HisA-IRES MLV-NA-IRES HIV-bsf-HA # 1-5 tidak dipotong enzim Xba; lajur 11: kontrol negatif ligasi (produk ligasi tidak mengandung DNA sisipan HA) dipotong dengan enzim ApaI menghasilkan pita DNA tunggal (linier)  $\pm$  7820 pb; lajur 12: kontrol negatif ligasi tidak dipotong enzim ApaI; lajur 13: pcDNA3.1/HisA-IRES MLV-NA- bsf- IRES HIV (wt) dipotong enzim ApaI menghasilkan pita DNA tunggal (linier)  $\pm$  7820 pb; lajur 14: wt tidak dipotong enzim ApaI.



Gambar 4.26b. Analisis hasil pemotongan klon dengan enzim restriksi endonuklease Xba pada gel agarosa 1 %. M: marka 2 log; lajur 15, 17, 19, 20: klon pcDNA3.1/HisA-IRES MLV-NA-bsf IRES HIV-HA # 6 - 9 dipotong enzim Xba menghasilkan 3 pita DNA (fragmen DNA  $\pm$  7133 pb; fragmen  $\pm$  1185 pb dan fragmen  $\pm$  399 pb); lajur 16, 18, 21: klon pcDNA3.1/HisA-IRES MLV-NA-bsf-IRES HIV-HA # 6, 7, 9 tidak dipotong enzim Xba; lajur 22: kontrol negatif ligasi (produk ligasi tidak mengandung DNA sisipan HA) dipotong dengan enzim ApaI menghasilkan pita DNA tunggal (linier)  $\pm$  7820 pb; lajur 23: kontrol negatif ligasi tidak dipotong enzim ApaI; lajur 24: pcDNA3.1/HisA-IRES MLV-NA-bsf IRES HIV-HA (wt) dipotong enzim ApaI menghasilkan pita DNA tunggal (linier)  $\pm$  7820 pb; lajur 25: wt tidak dipotong enzim ApaI.

### b) Identifikasi klon menggunakan teknik *sequencing*

Analisis hasil *sequencing* klon pcDNA3.1/His A-IRESMLV-NA-IRESHIV-HA#6 dengan primer H1413F dan N1R320 menunjukkan kebenaran arah orientasi dan susunan nukleotida IRES MLV, fragmen NA dan HA pada lampiran 3a, 3b dan 6b. Analisis homologi asam amino gen HA dan NA isolat dari ayam A/chicken/Indonesia/Jpf-001/07 (H5N1) dibandingkan dengan isolat dari manusia A/Indonesia/5/2005 dapat dilihat pada lampiran 2 dan 5.

### 4.2. Pembahasan

Pembentukan klon plasmid untuk ekspresi protein HA dan NA virus Influenza A H5N1 pada vektor peng ekspresi pcDNA3.1/HisA mengandung fragmen-fragmen IRES MLV, NA, IRES HIV dan HA secara berurutan dari arah 5' ke arah 3' telah dilakukan melalui beberapa tahap pengsubklonaan. Pada setiap tahap pengsubklonaan yang melibatkan proses pemotongan dengan menggunakan enzim restriksi endonuklease, ligasi dan transformasi serta identifikasi klon untuk pemastian adanya DNA sisipan maupun arah orientasi fragmen sisipan, merupakan faktor penentu pada pembentukan klon plasmid yang diinginkan.

Vektor pKS-IRES HIV# 2 mengandung fragmen IRES HIV orientasi terbalik dengan arah 3' ke arah 5' dipilih untuk pengsubklonaan fragmen BSF, dimana fragmen BSF disisipkan pada situs EcoRV dengan arah 5' ke arah 3'. Tujuannya adalah untuk mendapatkan fragmen IRES HIV-bsf dengan posisi BSF (3' → 5') pada hulu IRES HIV (5' → 3') dalam vektor pcDNA3.1/HisA-IRES MLV-NA seperti pada gambar 4.24. Berdasarkan hasil transformasi produk ligasi pKS-IRES HIV# 2-EcoRV dengan fragmen BSF *blunt*, diketahui koloni yang tumbuh pada kontrol negatif ligasi (produk ligasi tidak mengandung DNA sisipan BSF) berjumlah 70 klon, sedangkan produk ligasi hanya berjumlah 7 klon. Hal ini kemungkinan karena vektor pKS-IRESHIV# 2 belum terpotong sempurna oleh enzim restriksi endonuklease EcoRV, walaupun dari hasil analisis pada gel agarosa 0,8 % terlihat pita DNA linier. Pemotongan vektor yang belum sempurna dapat mengganggu pada proses ligasi. Pada penelitian, vektor pKS-IRESHIV-EcoRV tidak ditransformasi pada sel kompeten, sehingga tidak dapat diketahui jumlah transforman yang tumbuh pada media LB agar. Untuk pemastian bahwa

vektor telah terpotong sempurna, transforman yang tumbuh tidak lebih daripada 20 koloni.<sup>37</sup> Faktor kemungkinan lain adalah jumlah DNA dan enzim ligase DNA yang digunakan pada proses pengsubklonaan konsentrasinya rendah, sehingga proses penempelan molekul yang diligasi pada kedua ujung pemotongan sulit terjadi. Hal ini disebabkan pKS-IRESHIV# 2 yang dipotong oleh enzim restriksi EcoRV menghasilkan produk *blunt end*. Persyaratan pengsubklonaan DNA sisipan produk *blunt end* adalah menggunakan konsentrasi DNA dan enzim ligase yang tinggi dibandingkan dengan ligasi produk *sticky end*. Tujuannya adalah untuk meningkatkan kesempatan penggabungan ujung-ujung molekul dengan cara yang benar.<sup>14,37</sup> Pada kontrol negatif sel kompeten *E. coli* TOP 10 tidak ada pertumbuhan koloni pada media LB agar, dengan demikian sel *E. coli* yang digunakan sebagai sel kompeten bebas dari kontaminasi, selain itu memperlihatkan bahwa sel *E. coli* resisten terhadap antibiotik ampisilin pada konsentrasi 50 µg/mL dan kondisi antibiotik tidak rusak. Sebaliknya, pada kontrol positif untuk melihat kompetensi sel *E. coli* TOP 10 yang menggunakan plasmid pBluescript KS(-) menghasilkan sejumlah lebih kurang 300 koloni. Hal ini menunjukkan bahwa sel mempunyai kemampuan untuk melakukan proses transformasi DNA hasil ligasi ke dalam sel. Sel *E. coli* TOP 10 yang kompeten memiliki membran yang dibuat sensitif, sehingga DNA dapat masuk ke dalam sel dengan mudah.<sup>37</sup>

Identifikasi DNA sisipan BSF menggunakan enzim restriksi dan reaksi PCR, dilakukan untuk melihat DNA sisipan pada vektor pKS-IRES HIV dan juga untuk mengetahui adanya kemungkinan plasmid rekombinan membawa tandem DNA sisipan yang tidak diinginkan.<sup>37</sup> Linierisasi pKS-IRESHIV-bsf # 1 dan 3 dengan enzim restriksi endonuklease BamHI tidak berhasil dilakukan, karena selain ada pita DNA ukuran 3451 pb, terlihat juga pita DNA tidak spesifik pada klon pKS-IRES HIV (gambar 4.5). Kemungkinan yang terjadi adalah DNA belum terpotong sempurna sehingga DNA tidak berbentuk linier. Hal ini dapat disebabkan jumlah unit enzim yang ditambahkan ke dalam larutan restriksi tidak sesuai dengan konsentrasi DNA plasmid. Konsentrasi DNA yang lebih tinggi atau konsentrasi DNA yang lebih rendah dibandingkan dengan jumlah unit enzim restriksi endonuklease, menyebabkan enzim tidak dapat memotong DNA secara efisien.<sup>37</sup>

Berdasarkan hasil identifikasi menggunakan PCR *hotstar*, amplikon klonal pKS-IRES HIV-bsf # 1, 3, dan 4 diperoleh dari pasangan primer HIVR dengan BSFR tidak menghasilkan pita DNA dengan panjang lebih kurang 500 pb, seperti yang diharapkan. Pita DNA klonal pKS-IRES HIV-bsf tidak terbentuk, kemungkinan karena belum diketahui suhu penempelan yang optimum untuk pasangan primer HIVR dan BSFR yang dapat menghasilkan amplikon dengan panjang DNA spesifik ( $\pm$  500 pb). Amplikon kontrol positif menggunakan pasangan primer HIVR dan BSFR dengan cetakan DNA klonal pKS-IRES HIV# 2, menunjukkan adanya pita DNA yang tidak spesifik dengan panjang lebih kurang 500 pb, sedangkan yang diharapkan lebih kurang 280 pb (fragmen IRES HIV). Kemungkinan terdapat dua fragmen IRES HIV dengan arah 3' ke arah 5' dan arah 5' ke arah 3', sehingga membentuk pita DNA panjang lebih kurang 500 pb. Berdasarkan hasil identifikasi dengan menggunakan enzim restriksi dan reaksi PCR diperoleh klonal pKS-IRES HIV-bsf # 1, 3 dan 4, dimana posisi fragmen IRES HIV dari arah 3' ke arah 5' dan fragmen BSF dari arah 5' ke arah 3' dalam vektor pBluescript KS(-).

Pada penelitian ini, plasmid pcDNA3.1/HisA dipilih sebagai vektor *backbone* untuk pengklonan gen HA dan NA dengan alasan bahwa, vektor dapat digunakan untuk sistem ekspresi gen atau fragmen gen dengan tingkat kestabilan tinggi pada sel mamalia. Selain itu, protein rekombinan yang dihasilkan dari proses translasi pada sel mamalia dapat langsung dipurifikasi, karena plasmid membawa sebuah *polyhistidine metal-binding tag*. Polihistidin (6xHis) berfungsi pada proses purifikasi protein rekombinan, yang mempunyai afinitas pengikatan protein tinggi dengan menggunakan kolom *metal chelating resin*.<sup>13</sup>

Pemastian hasil pemotongan enzim HindIII pada vektor pcDNA3.1/HisA-NA untuk pengsubklonan fragmen IRES MLV, dilakukan dengan cara transformasi ke dalam sel *E. coli* yang dibuat kompeten. Walaupun hasil analisis pada gel agarosa terlihat bahwa vektor telah terpotong sempurna oleh enzim HindIII (tampak pita DNA linier), pada hasil transformasi koloni yang tumbuh pada media LB agar masih berjumlah 200 koloni (> 20 koloni). Jadi hasil transformasi menunjukkan bahwa vektor belum terpotong sempurna, berarti masih banyak plasmid yang berbentuk sirkuler. Dengan demikian, vektor tidak dapat digunakan

untuk penyisipan DNA fragmen MLV, sehingga dilakukan pemotongan kembali menggunakan enzim HindIII. Selanjutnya, setelah pemotongan enzim HindIII dilakukan penambahan enzim CIP yang bertujuan untuk menghilangkan gugus fosfat 5' pada kedua ujung pemotongan yang membentuk *sticky end*, dan untuk mencegah terjadinya ligasi kembali pada kedua ujung hasil pemotongan enzim maupun terbentuk sirkularisasi DNA plasmid.<sup>37</sup> Setelah penambahan CIP, vektor pcDNA3.1/HisA-NA-HindIII-cip diisolasi dari gel LMA 0,8 %, dengan tujuan untuk menyeleksi hasil potongan enzim pada plasmid agar diperoleh DNA plasmid yang terpotong sempurna. Analisis fragmen IRES MLV pada pKS-IRES MLV yang dipotong enzim HindIII pada gel LMA 1% dan vektor pcDNA3.1/HisA-NA-HindIII-cip pada gel LMA 0,8 % mengandung ungu kristal 1,6 µg/mL untuk pewarnaan DNA, dimana pada gel terlihat pita DNA yang berwarna ungu. Oleh karena pita DNA dapat dilihat secara langsung, sehingga tidak perlu diwarnai dengan larutan etidium bromida dan pengamatan di bawah sinar ultraviolet. Dengan demikian, pewarnaan DNA menggunakan kristal ungu pada proses isolasi gel dapat menghindari kerusakan DNA, sehingga menghasilkan DNA berkualitas tinggi dan kemurnian untai ganda.<sup>46</sup> *Deoxyribonuclease acid* (DNA) yang rusak mempunyai potensi menurunkan keberhasilan pengklonaan DNA. Pewarnaan DNA dengan ungu kristal juga dapat meningkatkan efisiensi transformasi ke dalam sel kompeten.<sup>46</sup> Hasil transformasi produk ligasi pcDNA3.1/HisA-NA-HindIII-cip dengan fragmen IRESMLV-HindIII diperoleh sejumlah 101 klon tumbuh pada LB agar, sedangkan koloni yang tumbuh dari kontrol negatif ligasi berjumlah 3 klon. Hasil identifikasi 20 klon dari 101 klon yang dipilih secara acak menunjukkan ada 17 klon mengandung sisipan fragmen IRESMLV. Hal ini menjelaskan bahwa DNA fragmen IRES MLV-HindIII maupun DNA vektor pcDNA3.1/HisA-NA-HindIII-cip memiliki kualitas dan kemurnian untai ganda yang tinggi, sehingga meningkatkan keberhasilan pengklonaan. Plasmid pcDNA3.1/HisA sebagai kontrol positif digunakan untuk melihat kompetensi sel *E. coli* TOP 10 menghasilkan sejumlah lebih kurang 115 koloni. Keberhasilan pengklonaan juga dipengaruhi oleh kompetensi sel, yang dapat dilihat dari pertumbuhan koloni pada kontrol positif plasmid yang sudah dioptimasi. Pada kontrol negatif sel kompeten

*E. coli* TOP 10 terlihat tidak ada pertumbuhan koloni, dengan demikian sel *E. coli* yang digunakan bebas dari kontaminasi, selain itu memperlihatkan bahwa sel *E. coli* resisten terhadap antibiotik ampisilin pada konsentrasi 50 µg/mL.

Ligasi fragmen DNA pada vektor plasmid dengan *sticky end* yang identik dapat menghasilkan plasmid rekombinan yang membawa DNA sisipan pada arah orientasi yang berbeda dari yang diinginkan ataupun membawa tandem DNA sisipan. Hasil pemotongan vektor menggunakan enzim HindIII menghasilkan bentuk *sticky end* identik. Oleh karena itu dilakukan identifikasi menggunakan reaksi PCR untuk mengetahui posisi dan konfigurasi dari DNA sisipan. Hasil reaksi PCR menggunakan pasangan primer MLVF dengan N1R320 dan primer MLVR dengan N1R320 membuktikan bahwa plasmid rekombinan yang terbentuk hanya terdapat satu sisipan fragmen DNA IRESMLV pada 18 klon. Namun, dari 18 klon yang mengandung DNA sisipan, diperoleh 4 klon pcDNA3.1/HisA-IRES MLV-NA (# 1, 16, 17 dan 20) yang mempunyai orientasi benar dengan susunan IRES MLV dari arah 5' ke arah 3' dan fragmen NA dari arah 5' ke arah 3'. semua. Klon pcDNA3.1/HisA-IRESMLV-NA # 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 11, 12, 13, 14, 15, dan 19 merupakan orientasi terbalik, yaitu susunan IRES MLV dari arah 3' ke arah 5' dan fragmen NA dari arah 5' ke arah 3'.

Proses pengsubklonaan IRES HIV-bsf# 1 ke dalam pcDNA3.1/HisA-IRESMLV-NA # 1 pada situs NotI – EcoRV menggunakan sistem *directional cloning*. Beberapa hal yang perlu diperhatikan pada penyiapan vektor untuk *directional cloning*, yaitu dipilih dua situs restriksi yang tidak saling berdekatan satu sama lain pada daerah situs pengklonaan dan dipastikan bahwa kedua enzim restriksi memotong sempurna pada vektor plasmid. Untuk pemastian vektor plasmid dipotong sempurna dilakukan analisis elektroforesis pada gel agarosa 0,8 %. Plasmid rekombinan pKS-IRES HIV-bsf # 1 yang dipotong dengan enzim restriksi endonuklease XhoI dan NotI menghasilkan produk *sticky end* pada kedua situs pemotongan, sedangkan vektor pcDNA3.1/HisA-IRES MLV-NA# 1 menghasilkan produk *blunt end* dan *sticky end*. Oleh karena proses pengsubklonaan dengan sistem *directional cloning*, maka hasil pemotongan enzim XhoI yang berupa *sticky end* pada pKS-IRESHIV-bsf dibuat menjadi *blunt end*,



menggunakan metode *blunt polish end* melalui reaksi PCR dengan enzim *platinum pfx DNA polimerase*. Proses ini dilakukan sebelum pemotongan vektor menggunakan enzim restriksi endonuklease NotI, sehingga pada akhir pemotongan plasmid oleh enzim dihasilkan produk *blunt* dan *sticky end*. Fragmen IRES MLV dan vektor diperoleh dari hasil isolasi gel LMA dengan pewarnaan ungu kristal, sehingga fragmen yang dihasilkan mengandung DNA murni konsentrasi tinggi. Oleh karena produk yang diligasi merupakan produk *blunt-end*, maka untuk proses ligasi fragmen IRESMLV-bsf dengan vektor pcDNA3.1/HisA-IRESMLV-NA digunakan enzim T4 DNA ligase konsentrasi tinggi. Kontrol positif untuk melihat kompetensi sel *E. coli* TOP 10 yang menggunakan plasmid pCDNA5/FRT menghasilkan lebih kurang 1000 koloni dan pcDNA3.1/HisA menghasilkan sejumlah lebih kurang 300 koloni. Hal ini menunjukkan bahwa sel mempunyai kemampuan untuk melakukan proses transformasi hasil ligasi. Hasil transformasi produk ligasi menghasilkan 25 klon tumbuh pada LB agar, sedangkan koloni yang tumbuh dari kontrol negatif ligasi (produk ligasi yang tidak mengandung DNA sisipan IRES MLV) berjumlah 11 klon. Pemastian fragmen IRES HIV-bsf dibuktikan menggunakan enzim restriksi endonuklease KpnI dan Xba. Plasmid rekombinan pcDNA3.1/HisA-IRES MLV-NA-IRES HIV-bsf mempunyai 2 situs restriksi KpnI yang mengapit fragmen NA, dan fragmen IRES HIV-bsf berada di antara situs KpnI dan Xba. Berdasarkan pemetaan situs restriksi, pemotongan plasmid menggunakan enzim KpnI dan Xba diperoleh DNA sisipan fragmen NA ( $\pm 1340$  pb), DNA fragmen IRES HIV-bsf ( $\pm 600$  pb) dan pita DNA berukuran ( $\pm 5760$  pb), yang terlihat pada klon pcDNA3.1/HisA-IRES MLV-NA-IRES HIV-bsf # 2, 3, 9, 11, 13, 14, 17, 19 dan 20 (gambar 4.18). Sebagai pembanding, digunakan klon yang berasal dari kontrol negatif ligasi dan vektor pcDNA3.1/HisA-IRES MLV-NA yang dipotong enzim KpnI dan Xba. Hasil pemotongan pada klon dan vektor, hanya menghasilkan dua pita DNA, yaitu pita DNA dengan panjang lebih kurang 5760 pb dan DNA sisipan fragmen NA ( $\pm 1340$  pb). Identifikasi untuk pemastian konfigurasi fragmen IRES HIV dan fragmen BSF pada klon pcDNA3.1/HisA-IRES MLV-NA-IRES HIV-bsf telah dibuktikan melalui reaksi PCR *hotstar* menggunakan pasangan primer HIVF dan HIVR, dan pasangan BSFF dan primer HIVR. Pasangan primer HIVF dan HIVR

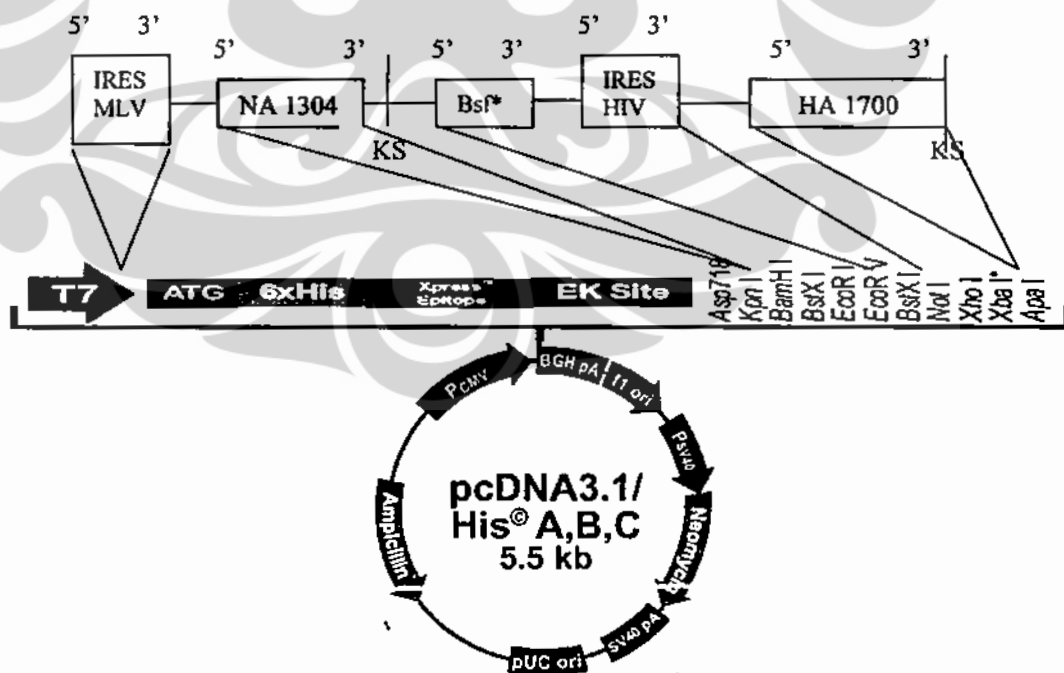


menghasilkan ampikon fragmen IRES HIV ( $\pm 280$  pb), dan ampikon fragmen BSF ( $\pm 210$  pb) diperoleh dari pasangan BSFF dan primer HIVR, dimana panjang DNA ampikon fragmen IRES HIV dan fragmen BSF sesuai dengan ukuran panjang masing-masing kontrol positif (gambar 4.19 dan 4.20). Oleh karena pengsubklonaan fragmen IRES HIV-bsf menggunakan sistem *directional cloning*, maka penyisipan fragmen DNA IRES HIV-bsf sesuai pada situs restriksi vektor pcDNA3.1/HisA-IRESMLV-NA NotI-*blunt*. Berdasarkan hasil identifikasi klon menggunakan enzim restriksi endonuklease maupun reaksi PCR *hotstar* diketahui bahwa klon pcDNA3.1/HisA-IRES MLV-NA-IRES HIV-bsf # 2, 3, 9, 11, 12, 14, 15, 16, 17, 19, dan 20 mengandung satu fragmen IRES HIV-bsf.

Pengsubklonaan fragmen HA ke dalam plasmid rekombinan pcDNA3.1/HisA-IRESMLV-NA-IRESHIV-bsf#17 pada situs restriksi XbaI (*blunt*) dan ApaI dilakukan dengan sistem *directional cloning*. Fragmen HA diperoleh dari plasmid pcDNA5/FRT-Hasc yang dipotong enzim HindIII dan ApaI, yang menghasilkan produk *sticky end*. Setelah pcDNA5/FRT-Hasc dipotong enzim HindIII, kemudian dilakukan *blunt polish end* dan dilanjutkan pemotongan menggunakan enzim ApaI, sehingga dihasilkan produk *blunt-end* dan *sticky end*. Demikian juga vektor pcDNA3.1/HisA-IRESMLV-NA-IRESHIV-bsf#17 yang dipotong enzim Xba menghasilkan produk *sticky end*, sehingga perlu dilakukan *blunt polish end* sebelum pemotongan menggunakan enzim ApaI. Selanjutnya, untuk mendapatkan produk yang mengandung DNA konsentrasi tinggi, maka fragmen HA dan vektor diisolasi dari gel LMA dengan pewarnaan ungu kristal. Hasil transformasi produk ligasi QG-HA dengan QG NA-IRESMLV-IRESHIV-bsf menghasilkan sejumlah 232 klon tumbuh pada LB agar, sedangkan koloni yang tumbuh dari kontrol negatif ligasi berjumlah 63 klon dan kontrol positif untuk melihat kompetensi sel *E. coli* TOP 10 yang menggunakan plasmid pcDNA5/FRT menghasilkan sejumlah lebih kurang 500 koloni. Analisis hasil isolasi dari 10 klon diperoleh 9 klon mengandung DNA sisipan fragmen HA. Linierisasi klon pcDNA3.1/HisA-IRESMLV-NA-IRESHIV-bsf-HA# 1-9 menggunakan enzim ApaI, menunjukkan adanya satu DNA sisipan fragmen HA ( $\pm 1700$  pb) pada setiap klon, sehingga terlihat ukuran panjang plasmid rekombinan menjadi lebih kurang 9520 pb.

adanya satu DNA sisipan fragmen HA ( $\pm 1700$  pb) pada setiap klon, sehingga terlihat ukuran panjang plasmid rekombinan menjadi lebih kurang 9520 pb. Berdasarkan pemetaan situs restriksi, pada fragmen HA terdapat tiga situs restriksi XbaI, yaitu pada posisi 210 pb, 1335 pb dan 1392 pb, sedangkan situs restriksi XbaI pada vektor pcDNA3.1/HisA-IRES MLV-NA-IRES HIV-bsf terdapat pada posisi 1074 pb. Dengan demikian, identifikasi klon menggunakan enzim restriksi endonuklease XbaI seharusnya menghasilkan empat pita DNA berukuran lebih kurang 7133 pb, 1185 pb, 864 pb dan 400 pb. Namun demikian, analisis pada gel agarosa 0,8 % hanya terlihat 3 pita DNA, yaitu ukuran  $\pm 7133$  pb,  $\pm 400$  pb, hal ini mungkin pita DNA ukuran  $\pm 864$  pb berhimpitan dengan pita DNA ukuran  $\pm 1185$  pb. Jadi analisis klon menggunakan enzim ApaI maupun XbaI menunjukkan bahwa klon pcDNA3.1/HisA-IRES MLV-NA-IRES HIV-bsf-HA # 1-9 mengandung sisipan fragmen HA.

Gambar 4.24 memperlihatkan hasil konstruksi klon plasmid pada vektor pengeksresi pcDNA3.1/HisA yang mengandung fragmen-fragmen IRES MLV, NA, IRES HIV-bsf, HA secara berurutan dari arah 5' ke arah 3' atau disebut sebagai klon pcDNA3.1/HisA-IRES MLV-NA -bsf-IRES HIV-HA.



Gambar 4.27. Struktur klon pcDNA3.1/HisA-IRES MLV-NA-bsf-IRES HIV-HA; KS: kodon stop; Tanda\*: fragmen BSF orientasi terbalik.

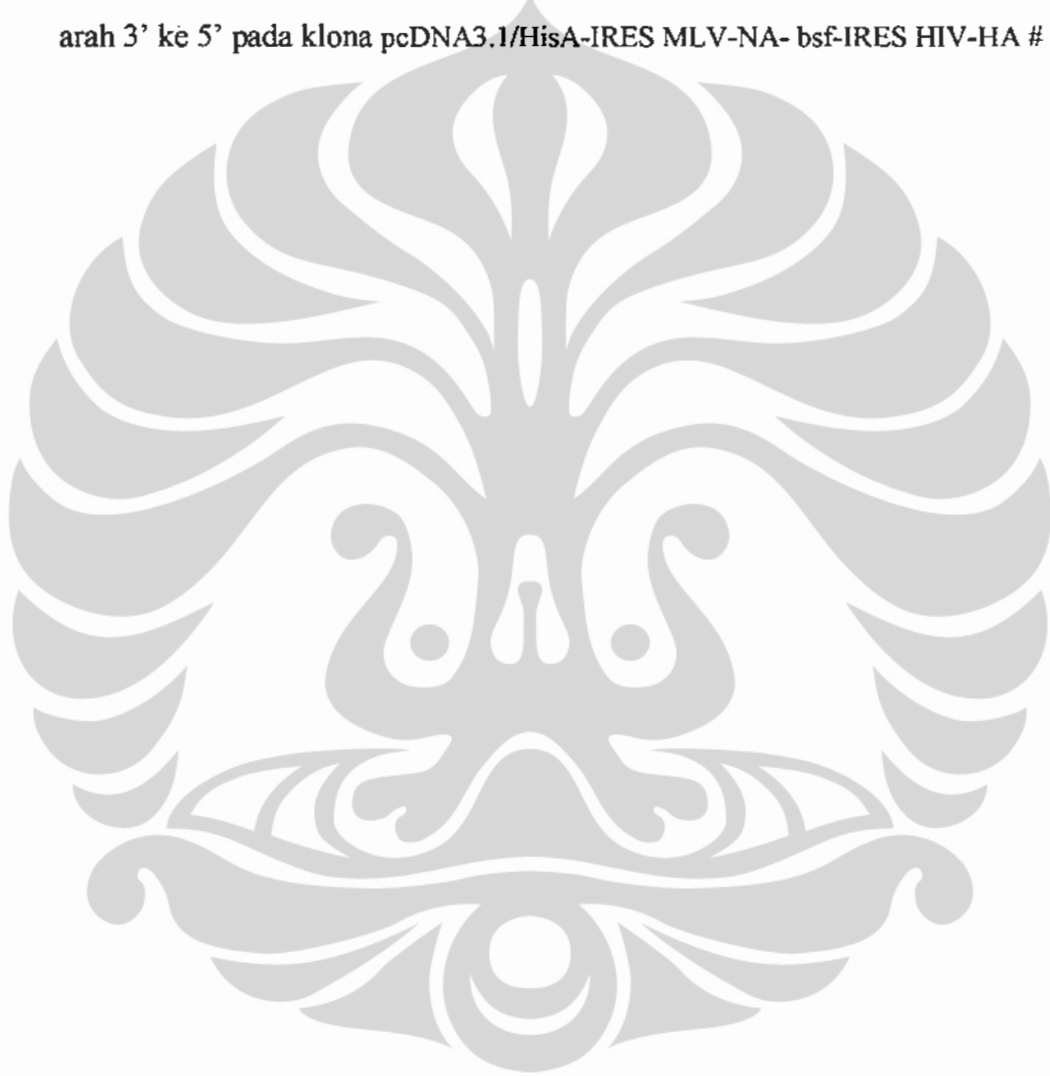
Berdasarkan analisis dengan teknik PCR, enzim restriksi endonuklease dan teknik *sequencing* diketahui arah orientasi adanya DNA sisipan; ada tidaknya tandem DNA sisipan dan akurasi susunan nukleotida fragmen DNA sisipan yang diklona ke dalam vektor pcDNA3.1/His A.

Tahap selanjutnya, klon pcDNA3.1/HisA-IRES MLV-NA-IRES HIV-bsf-HA akan ditransfeksi ke dalam sel mamalia, namun pada penelitian ini tidak dilakukan transfeksi klon. Asumsi yang diharapkan apabila klon pcDNA3.1/HisA-IRES MLV-NA-IRES HIV-bsf-HA ditransfeksikan ke dalam sel mamalia, yaitu: mekanisme IRES MLV dan IRES HIV berlangsung dengan cara tidak saling tergantung satu sama lain dan dapat menghasilkan protein NA dan HA dalam jumlah yang seimbang dan waktu bersamaan pada fase G2 / mitosis dalam siklus sel. Jang *et al* pada tahun 2006, meneliti mengenai mRNA bisistronik sintetik yang mengandung dua reporter gen dan dua elemen IRES, yang berasal dari genus Poliovirus (PV) dan Encephalomyocarditis virus (ECMV), kedua genera ini merupakan famili Picornaviridae. Jang telah melakukan penelitian pendahuluan mengenai translasi RNA bisistronik pada sel *Rabbit reticulocyte lysate* (RRL) dan diketahui bahwa IRES PV memiliki sistem translasi lemah, sedangkan IRES ECMV memiliki sistem translasi kuat. Skema mRNA bisistronik sintetik dibuat dengan meletakkan reporter gen A setelah NTR 5' PV (memiliki sistem translasi lemah), diikuti dengan NTR 5' EMCV (memiliki sistem translasi kuat) dan reporter gen B. Berdasarkan analisis translasi mRNA bisistronik secara *in vitro*, diketahui bahwa produk gen B dihasilkan lebih awal dibandingkan dengan produk gen A, dan efisiensi translasi gen B tidak dipengaruhi oleh gen A. Data ini menunjukkan bahwa translasi gen B pada NTR 5'EMCV tidak tergantung pada translasi gen A, namun NTR 5'EMCV diperlukan pada proses translasi gen B. Dengan demikian, jika IRES MLV dan IRES HIV dalam konstruksi ini memiliki sistem translasi yang kuat, kemungkinan dapat menghasilkan protein HA dan NA virus influenza A H5N1 dalam bentuk VLP pada sel mamalia, dengan rasio jumlah molekul NA berbanding HA lebih tinggi dari rasio NA berbanding HA pada partikel virus infeksius. Rasio NA berbanding HA pada partikel virus infeksius adalah 1:4 sampai 1:5.<sup>1</sup>

Hasil analisis menggunakan BIOEDIT versi 7.0 (*sequence identity matrix*) diketahui bahwa homologi sekuen NA ( $\pm$  1304 pb) isolat dari ayam A/chicken/Indonesia/Jpf-001/07 (H5N1) dibandingkan dengan sekuen NA Influenza A H5N1 isolat dari manusia A/Indonesia/5/2005 adalah 91,9 % (lampiran 2). Perubahan tersebut disebabkan karena terdapat delesi satu atau dua nukleotida di beberapa tempat sepanjang sekuen fragmen NA ( $\pm$  1304 pb), sehingga menghasilkan asam amino yang berbeda. Faktor-faktor yang dapat menyebabkan perubahan tersebut, yaitu kemungkinan mutasi terjadi pada proses pengklonaaan atau ada perbedaan susunan asam amino antara gen NA isolat dari ayam A/chicken/Indonesia/Jpf-001/07 (H5N1) dengan gen NA isolat dari manusia A/Indonesia/5/2005. Posisi fragmen IRES MLV terletak pada situs restriksi HindIII dan fragmen NA terletak pada situs restriksi KpnI pada vektor *backbone* pcDNA3.1/His A, sesuai dengan konstruksi yang dirancang (lampiran 3b). Berdasarkan analisis hasil *sequencing* klon a pcDNA3.1/His A-IRES MLV-NA-IRES HIV-HA (6) menggunakan primer N1R320 pada posisi 320 pb dari arah 3' ke 5' terlihat kebenaran arah orientasi dan susunan nukleotida fragmen IRES MLV dan fragmen NA dalam vektor pcDNA3.1/His A (lampiran 3a dan 3b). Hasil perhitungan *sequence identity matrix* fragmen IRES MLV menunjukkan nilai homologi dibandingkan dengan plasmid pAMS adalah 99,4 %. Sekuen gen HA ( $\pm$  1700 pb) A/chicken/Indonesia/Jpf-001/07 (H5N1) dibandingkan dengan sekuen HA Influenza A H5N1 isolat dari manusia A/Indonesia/5/2005 memperlihatkan nilai homologi 94,2 % (lampiran 5), sedangkan fragmen IRES HIV dalam plasmid pBluescript KS (-) dibandingkan dengan gen pNL4.3 adalah 98,7 % (lampiran 6a). Hasil *sequencing* klon a menggunakan primer H1413F menunjukkan kebenaran arah dan susunan nukleotida fragmen HA pada posisi 1413 pb dari arah 5' ke arah 3' di dalam vektor *backbone* sesuai dengan konstruksi (lampiran 6b). Fragmen IRES HIV dan IRES MLV tidak memberikan nilai homologi 100 %, namun diasumsikan tidak akan mempengaruhi fungsi IRES dalam proses translasi protein HA dan NA, karena susunan nukleotida pada IRES tidak membentuk translasi asam amino. Kebenaran arah orientasi dan susunan nukleotida fragmen BSF belum dapat diketahui karena belum dilakukan *sequencing*. Namun demikian, jika hasil *sequencing* tidak menunjukkan homologi

100 %, maka hal tersebut tidak akan mempengaruhi proses translasi protein.

Hasil *sequencing* yang telah dilakukan belum dapat mengetahui secara lengkap kebenaran arah orientasi dan akurasi susunan nukleotida plasmid pengeksresi yang mengandung fragmen IRES MLV, NA, bsf, IRES HIV dan HA dalam vektor pcDNA3.1/His A. Oleh karena itu, perlu dilakukan *sequencing* dengan menggunakan primer *forward* dari arah 5' ke 3' dan primer *reverse* dari arah 3' ke 5' pada klon pcDNA3.1/HisA-IRES MLV-NA- bsf-IRES HIV-HA # 6.



## BAB 5

### KESIMPULAN DAN SARAN

#### 5.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian ini dapat disimpulkan:

1. Konstruksi vektor rekombinan pengeksresi protein HA dan NA virus Influenza A H5N1 telah berhasil dilakukan pada sistem ekspresi mamalia pcDNA3.1/His A.
2. Sembilan klon plasmid yang diperoleh mengandung fragmen-fragmen IRES MLV, NA, IRES HIV-bsf, HA dan telah diketahui arah orientasinya yang berurutan dari arah 5' ke arah 3' disebut sebagai klon pcDNA3.1/HisA-IRES MLV-NA-IRES HIV-HA.
3. Akurasi *susunan* nukleotida IRES MLV, NA, BSF, IRES HIV dan HA pada vektor pengeksresi pcDNA3.1/His A belum dapat dibuktikan secara lengkap menggunakan teknik *sequencing* dengan primer N1R320 dan H1413F pada klon pcDNA3.1/HisA-IRESMLV-NA- IRESHIV-HA # 6.

#### 5.2 Saran

Berdasarkan hasil penelitian, perlu dilakukan penelitian lanjutan untuk penyempurnaan penelitian ini. Beberapa saran yang dapat digunakan untuk penelitian lanjutan, antara lain:

1. Perlu dilakukan *sequencing* dengan menggunakan primer *forward* dari arah 5' ke 3' dan primer *reverse* dari arah 3' ke 5' pada klon pcDNA3.1/HisA-IRES MLV-NA- bsf-IRES HIV-HA # 6.
2. Perlu dilakukan transfeksi pada sel mamalia, sehingga dapat diketahui pengaruh sisipan IRES MLV dan IRES HIV terhadap tingkat ekspresi VLP Influenza A H5N1.
3. Perlu dilakukan tahap lebih lanjut untuk pengembangan prototipe vaksin ekspresi VLP Influenza A H5N1, seperti:
  - a. Analisis kultur sel dan supernatan hasil transfeksi dengan teknik imunofluoresen;

- b. Analisis protein *sodium dodecyl sulphate polyacrilamide gel electrophoresis* (SDS-PAGE) dan *Western blot*;
- c. Analisis protein VLP-HA-NA pada pelet dan supernatan menggunakan deteksi dengan mikroskop elektron.



## DAFTAR REFERENSI

1. Knipe DM, Lowry DR. Fundamental virology. In: Lamb RA dan Krug RM H, editors. Orthomyxoviridae: The viruses and their replication. 4<sup>th</sup> ed. Philadelphia: Lippincott William & Wilkins; 2001. p.725-28, 741-44.
2. Ross LG, Subbarao K. Emerging respiratory viruses: Challenges and vaccine strategies. *Clinical Microbiology Reviews*. 2006. p.622-27.
3. Centers for Disease Control and Prevention. 1998. Update: isolation of avian influenza A (H5N1) viruses from humans – Hong Kong 1997-1998. *Morbidity and Mortality Weekly Report* 46; 1245-47.
4. Cumulative Number of Confirmed Human Cases of Avian Influenza A/(H5N1). Tanggal akses 4 Maret 2008. Didapat dari <http://www.who.int>.
5. Booy R, Brown LE, Grohmann GS, Macintyre CR. Pandemic vaccines: promises and pitfalls. *The Medicine Journal of Australia*. 2006; 185 (10 Suppl): S26-S65.
6. Fouchier RAM, Munster V, Wallensten A, Bestebroer TM, Herfst S, Smith D et al. Characterization of a Novel Influenza A Virus Hemagglutinin Subtype (H16) Obtained from Black-Headed Gulls. *J.Virology*.2005; 79(5): 2814-22.
7. Noad R, Roy P. Virus-like particles as immunogens. *Trends in Microbiology*. 2003; 11 (9):438-44.
8. Garcea RL, Gissman L. Virus-like particles as vaccines and vessels for the delivery of small molecules. *Current Opinion in Biotechnology*. 2004; 15: 513-17.
9. Bright RA, Carter DM, Crevar CJ, Toapanta FR, Steckbeck JD, Cole KS et al. Cross-clade protective immune responses to influenza viruses with H5N1 HA and NA elicited by an influenza virus-like particle. Tanggal akses 14 April 2008. Didapat dari <http://www.pubmedcentral.nih.gov>.
10. Chen BJ, Leser GP, Morita EM, Lamb RA. Influenza Virus Hemagglutinin and Neuraminidase, but Not the Matrix Protein, Are Required for Assembly and Budding of Plasmid-Derived Virus-Like Particles. *JVI*. 2007; 81:7111-123.
11. Satterlee B. Production of H5N1 avian influenza virus vaccine by plasmid-based reverse genetics technology. *MMG 445 Basic Biotechnology eJournal*. 2008;4:93-98. Tanggal akses 7 Juni 2009. Didapat dari <http://www.ejournal.vudat.msu.edu>.



12. Phase 1 Study of a H5N1 Influenza Vaccine (Reverse Genetic Reassortant). NIH. Tanggal akses 7 Juni 2009. Didapat dari <http://www.clinicaltrials.gov>.
13. Invitrogen, 2001. pcDNA3.1/HisA<sup>®</sup> A, B, and C. Tanggal akses 3 Pebruari 2009. Didapat dari: [http://www.invitrogen.com/tech\\_service@invitrogen.com](http://www.invitrogen.com/tech_service@invitrogen.com)
14. Brown TA. Gene cloning: an introduction. 3<sup>rd</sup> ed. London: Chapman and Hall; 1995.p.271.
15. Qiagen 2003. Qiagen purification handbook.
16. Vigerust DJ, Sheppherd VL. Virus glycosylation: role in virulence and immune interactions. *Trends in Microbiology*. Rev. 2007; 15 (5): 211-18.
17. Quan Fu-Shi, Huang C, Compans RW, Kang Sang-Moo. Virus-Like Particle Vaccine Induces Protective Immunity against Homologous and Heterologous Strains of Influenza Virus. *J. Virology*. 2007; 81(7): 3514-24.
18. Subbarao K, Joseph T. Scientific barriers to developing vaccines against avian influeza viruses. *Nature Reviews Immunology*. 2007.p.1-12.
19. de Jong MD, Hien TT. Avian influenza A (H5N1). *J. Clinical Virology*. 2006; 35: 2-13.
20. Steinhauer DA. Role of hemagglutine cleavage for the pathogenecity on influenza virus. *Virology*. 1999; 258:1-20.
21. Haque A, Hober D, Kasper LH. Perspective: Confronting potential Influenza A (H5N1) pandemic with better vaccines. *Emerging Infectious Diseases* 2007; 13(10):1512-18.
22. Howley PM, Lowry DR. Fields virology. In: Wright PF, Webster RG, editors. *Orthomyxoviruses*. 4<sup>th</sup> ed. Philadelphia: Lippincott William & Wilkins; 2001. p.1536-40, 1547-50, 1554-55.
23. Avian influenza A (H5N1) infection in humans. *N Engl J Med*. 2005; 353:1374-85. Tanggal akses 13 Juli 2008. Didapat dari <http://www.nejm.org>.
24. Hioe CE, Sissoko ND, Philpott M, Hinshaw VS. Overlapping cytotoxic T-lymphocyte and B cell antigenic sites on the Influenza Virus H5 Hemagglutin. *J. Virology*. 1990;64(12):6246-51.
25. Fermentas. 2008-2009. Tanggal akses 25 Nopember 2008. Didapat dari <http://www.fermentas.com>
26. *Encyclopedia of Life Sciences*. DNA cloning. Quail MA. Cambrige UK. John Willey & sons; 2005, p.1-10.

27. Qiagen 2002. Superfect transfection reagen book.
28. Brasey A, Lopez-Lastra M, Ohlmann T, Beerens N, Berkhout B, Darlix JL, Sonenberg N et al. The leader of Human Immunodeficiency Virus type I genomic RNA harbours an internal ribosome entry segment that is active during the G<sub>2</sub>/M phase of the cell cycle. *J. Virol.* 2003;77(7):3939-49.
29. Berlioz C, Darlix JL. An internal ribosomal entry mechanism promotes translation of Murine Leukemia Virus *gag* polyprotein precursor. *J. Virol.* 1995;69(4):2214-22.
30. Deffaud C, Darlix JL. Characterization of an internal ribosomal entry segment in the 5'leader of Murine Leukemia Virus *env* RNA. *J. Virol.* 2000;74(2): 846- 50.
31. Buck CB, Shen X, Egan MA, Pierson TC, Walker CM, Siliciano RF. The Human Immunodeficiency Virus type 1 *gag* gene encodes an internal ribosome entry site. *J. Virol.* 2001;75(1):181-191.
32. Hellen CUT, Sarnow P. Internal ribosome entry sites in eukaryotic mRNA molecules. *Genes and Development.* 2001;15: 1593-1612.
33. Baird SD, Turcotte M, Korneluk RG, Holcik M. RNA: Searching for IRES. 2006;12:1755-85.
34. Komar AA, Hatzoglous M. Internal ribosome entry sites in cellular mRNAs: mystery of their existence. [Minireview] 2005. Tanggal akses 14 Agustus 2008. Didapat dari <http://www.jbc.org>.
35. Balvay L, Lastra Lopez M, Sargueil B, Darlix JL, Ohlmann T. Translational control of retroviruses. *Nature Publishing Group.* 2007; 5: 128-140.
36. Qiagen. 2003. Qiagen purification handbook.
37. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular cloning: A laboratory manual.* 2<sup>nd</sup> edition. Cold Spring Harbour Laboratory.1989.
38. Jawetz, Melnick, Adelberg's. *Medical Microbiology.* 23<sup>rd</sup> Edition. The McGraw-Hill Companies. New York. 2004. p. 536-542.
39. Jang SK. Internal initiation: IRES elements of Picornaviruses and Hepatitis C virus. *Virus Research.* 2006; 119: 2-15.
40. Flint SJ, Enquist LW, Krug LM, Racaniello VR, Skalka AM. *Principles of Virology: Molecular Biology, Pathogenesis and Control.* Washington DC. ASM Press. 2000. p.759-61.

41. GenWay biotech. 2009. Tanggal akses 25 Maret 2009. Didapat dari <http://www.genwaybio.com>.
42. Puertas PG, Mena I, Castillo M, Vivo A, Pastrana EP, Portela P. Efficient formation of influenza virus-like particles: dependence on the expression levels of viral proteins. *Journal of General Virology*. 1999;80:1635-45.
43. Szécsi J, Boson B, Johnsson P, Lacas PD, Matrosovich M, Klenk HD, Klatzmann D. et al. Short report: Induction of neutralising antibodies by virus-like particles harbouring surface proteins from highly pathogenic H5N1 and H7N1 influenza viruses. *Virology Journal* 2006; 3:70
44. Ehrlich HJ, Müller M, Helen, Tambyah PA, Joukhadar C, Montomoli E et al. Clinical Trial of a Whole-Virus H5N1 Vaccine Derived from Cell Culture. *N Engl J Med* 2008; 358:2573-84.
45. Avian influenza-situation in Egypt - update 18. Tanggal akses 7 Juni 2009. Didapat dari <http://www.who.int>.
46. StrataClone blunt PCR cloning kit. 2008. Tanggal akses 13 Nopember 2008. Didapat dari <http://www.stratagene.com>.
47. Abbas AK, Lichtman AH. *Cellular and molecular immunology*. Fifth edition, updated edition. Elsevier Saunders. 2005. p. 65, 86.
48. Subbarao K dan Murphy B. Live H5N1 avian flu virus vaccines show protection in animal studies. 2006. Tanggal akses 15 Juni 2009. Didapat dari <http://www.nih.gov>.
49. Pushko P, Tumpey TM, Bu F, Knell J, Robinson R, Smith G. Influenza virus-like particles comprised of the HA, NA, and M1 proteins of H9N2 influenza virus induce protective immune responses in BALB/c mice. *Vaccine* 2005. Tanggal akses 28 Mei 2007. Didapat dari <http://www.sciencedirect.com>.

## RIWAYAT HIDUP

1. Nama : Elizabeth Ika Prawahju Arisetianingsih
2. NPM : 06 06 000 062
3. Alamat : Jl. Pisangan Baru Tengah Rt.04/Rw.012 / 3  
Jakarta Timur 13110
4. Agama : Kristen Protestan
5. Tempat /  
Tanggal Lahir : Belitung, 31 Mei 1964



### 6. Riwayat Pendidikan :

- |     |  |                  |
|-----|--|------------------|
| SD  | : SD Unit Penambangan Timah Belitung   | Lulus tahun 1976 |
| SMP | : SMP Negeri I Tanjung Pandan Belitung   | Lulus tahun 1980 |
| SMA | : Sedes Sapientiae - Semarang  | Lulus tahun 1983 |
| S1  | : Universitas Gadjah Mada - Yogyakarta<br>Fakultas Biologi                                     | Lulus tahun 1988 |
| S2  | : Universitas Indonesia - Jakarta<br>Program Magister Ilmu Biomedik<br>Kekhususan Mikrobiologi | Lulus tahun 2009 |

### 7. Riwayat Pekerjaan :

- |   |                           |
|---|---------------------------|
| - Pusat Pemeriksaan Obat dan Makanan (PPOM)<br>Direktorat Jenderal Pengawas Obat dan Makanan<br>Departemen Kesehatan RI (DitJen POM RI) | 1989-2001                 |
| - Pusat Pengujian Obat dan Makanan Nasional (PPOMN)<br>Badan Pengawas Obat dan Makanan (Badan POM) RI                                   | 2001 - sampai<br>sekarang |

8. Biaya penelitian : Program Insentif Riset Terapan tahun 2008  
Bidang Teknologi Kesehatan dan Obat-Obatan

Applied Biosystems

klona-N1R320\_2009-04-28\_004

Inst Model/Name 3100/EUKMAN\_INSTITUTE\_JAKARTA-18330-040

Apr 28, 2009 04:18PM, GMT+07:00

klona-N1R320

KB\_3130\_POP7\_BDTV3.mob

Apr 28, 2009 04:31PM, GMT+07:00

Pls 2529 to 13860 Pk1 Loc:2504

Spacing:13.26 Pls/Panel1500

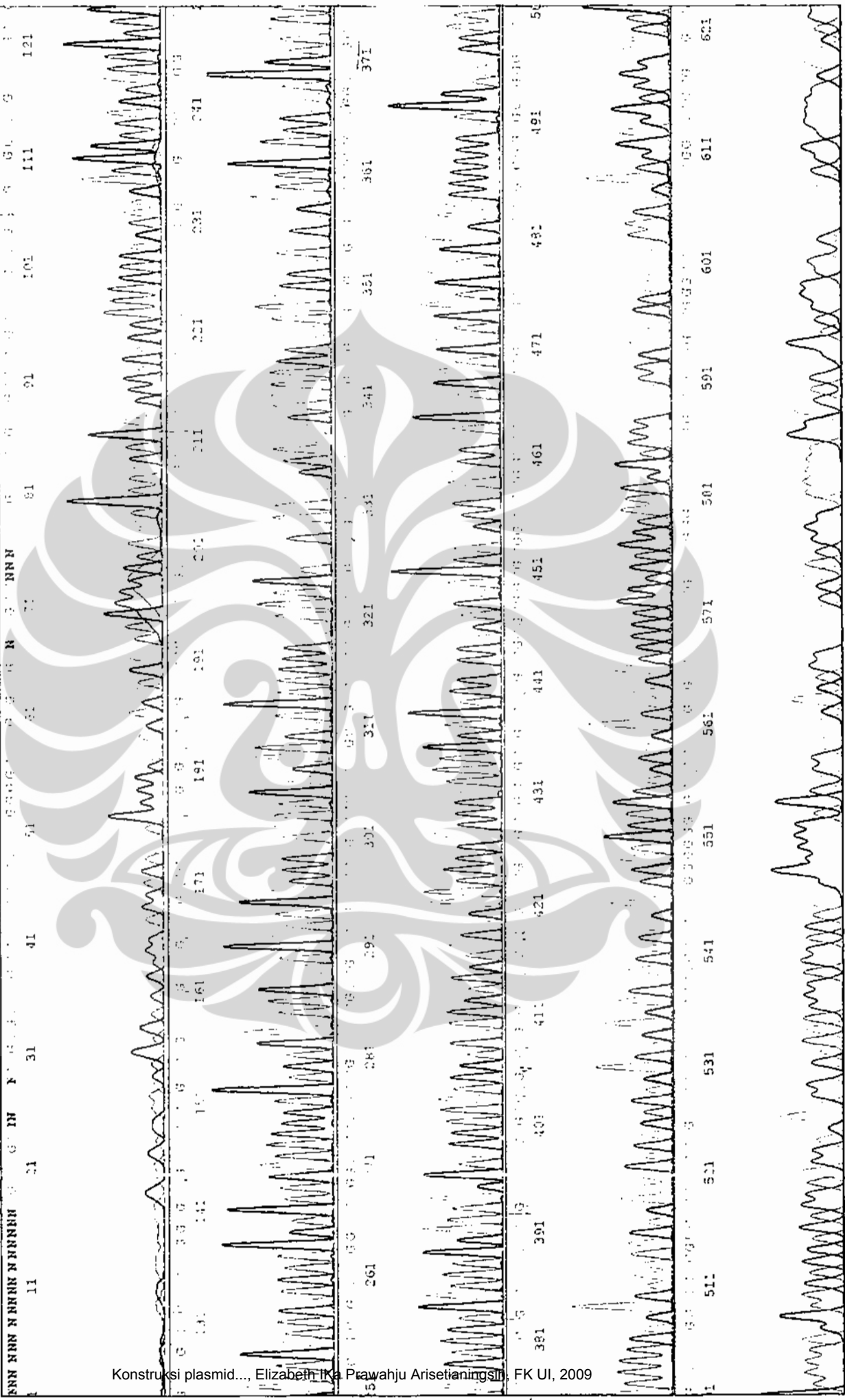
Version 5.2 Patch2 HISQV Bases: 748

Plate Name: seq\_28042009

S/N G:103 A:50 T:49 C:50

KB.bcp

KB 1.2 Cap:4



Konstruksi plasmid..., Elizabeth Ika Prawahju Arisetianingsih, FK UI, 2009

Lampiran 2: Homologi asam amino NA ( $\pm$  1304 pb) isolat dari ayam A/chicken/Indonesia/Jpf-001/07 (H5N1) [1] dibandingkan dengan asam amino NA Influenza A H5N1 isolat dari manusia A/Indonesia/5/2005 [2] (gene bank# EU146623, 2007) \*

```

          10          20          30          40          50
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
1 TSTPTGLAKTEAXTEX**VVLGVRLPLXITQGLSLLLGGQVFLAMMAPVG* 50
2 TSTPTGLSKTEALTEH**VVLWVRLPLHITQGLSLLLGGQVFLAMMAPVG* 50

          60          70          80          90          100
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
1 QLEFLAQTMRLWLY*NTMA**QTLSRVGGTTY*ELKSLNVHV*MALALL* 100
2 QLEFLAQTMRLWLY*NTMA**QTLSRVGGTTY*ELKSLNVHV*MALALL* 100

          110          120          130          140          150
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
1 *LMDQVMGRHHIRSSKWKKGKWSNQSNWMLLIITMRSAPVILMPAKSHVF 150
2 *LMDQVMGRHHIRSSKWKKEKWSNQSNWMLLIITMRNAPVILMPAKSHVF 150

          160          170
.....|.....|.....|.....|..
1 AGIIWHGNSRNPWGIFQSKFWSI 172
2 AGIIXHGNSRNPWXIFQSKFXSI 172

          10          20          30          40          50
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
1 ACVNGSCFTVMTDGPNSGQASYKIFKMEKGKVVKSVELDAPNYHYEECS 50
2 ACVNGSCFTVMTDGPNSGQASYKIFKMEKGKVVKSVELDAPNYHYEECS 50

          60          70          80          90          100
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
1 YPDAGEITCVCARDNWHGNSRNPWVSFNQNLLEYQIGYICSGVFGDNPRPNDG 100
2 YPDAGEITCVCARDNWHGNSRNPWVSFNQNLLEYQIGYICSGVFGDNPRPNDG 100

          110          120          130          140          150
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
1 TGSCGPMSPNGAYGVKGFSEKYGNGVWIGRTKSTNSRSGFEMIWDPNPWT 150
2 TGSCGPMSPNGAYGVKGFSEKYGNGVWIGRTKSTNSRSGFEMIWDPNPWT 150

          160          170          180          190          200
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
1 GTDSSFSVKQDIVAITDWSGYSGSFVQHPELTGLDCIRPCFWVELIRGRP 200
2 GTDSSFSVKQDIVAITDWSGYSGSFVQHPELTGLDCIRPCFWVELIRGRP 200

.....|..
1 KSGEHPS 207
2 KESTIWT 207

```

(lanjutan)

```

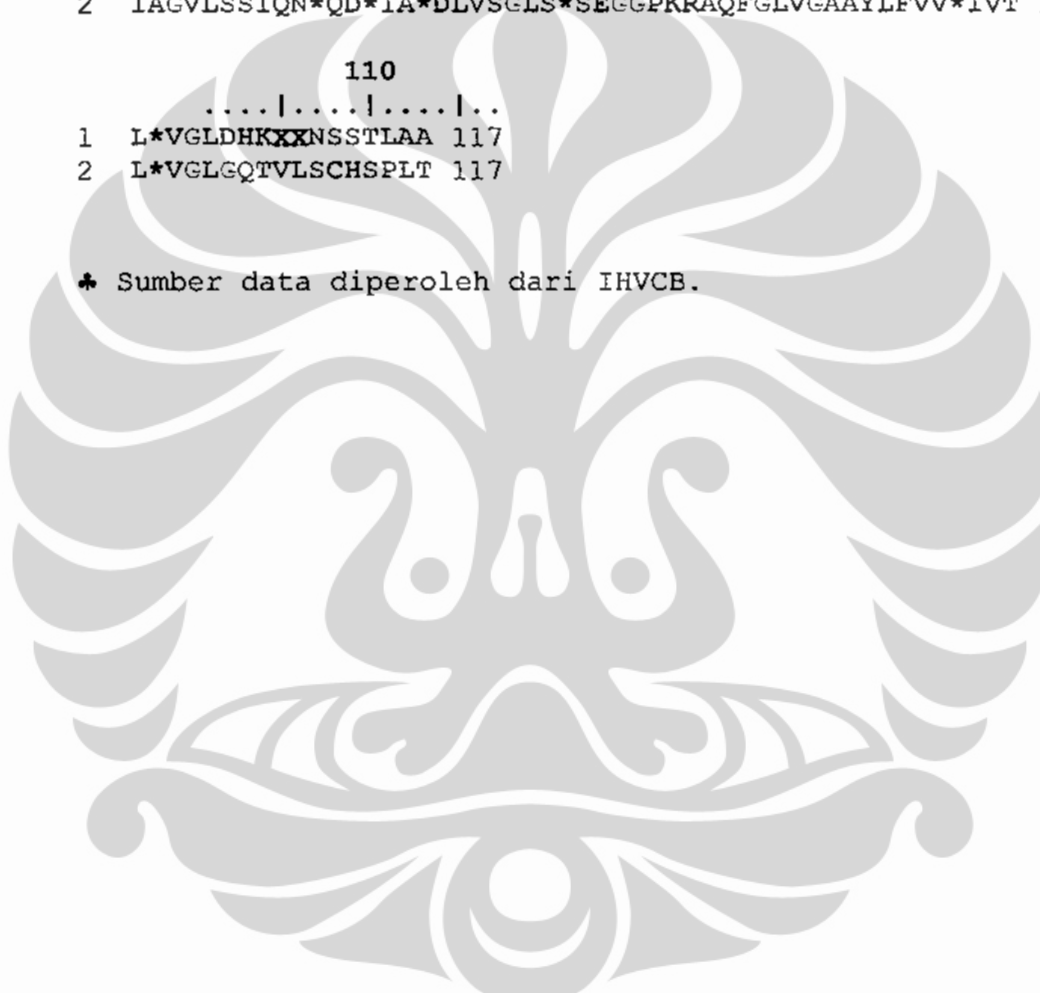
          10          20          30          40          50
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
1  KTAMGFPGPKPKALIPGAALK*FGIQMGGLERTVAFQ*NKI**Q*LIGQD 50
2  NTAMVFGSGEPKALIPGAALK*FGIQMGGLERTVAFQ*NKI**Q*LIGQD 50

          60          70          80          90          100
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
1  IAGVLSSIQN*QD*IA*DLVSGLS*SEGGPKRAQFGLVGAAYLFVV*IVT 100
2  IAGVLSSIQN*QD*IA*DLVSGLS*SEGGPKRAQFGLVGAAYLFVV*IVT 100

          110
.....|.....|.....|...
1  L*VGLDHKXXNSSTLAA 117
2  L*VGLGQTVLSCHSPLT 117

```

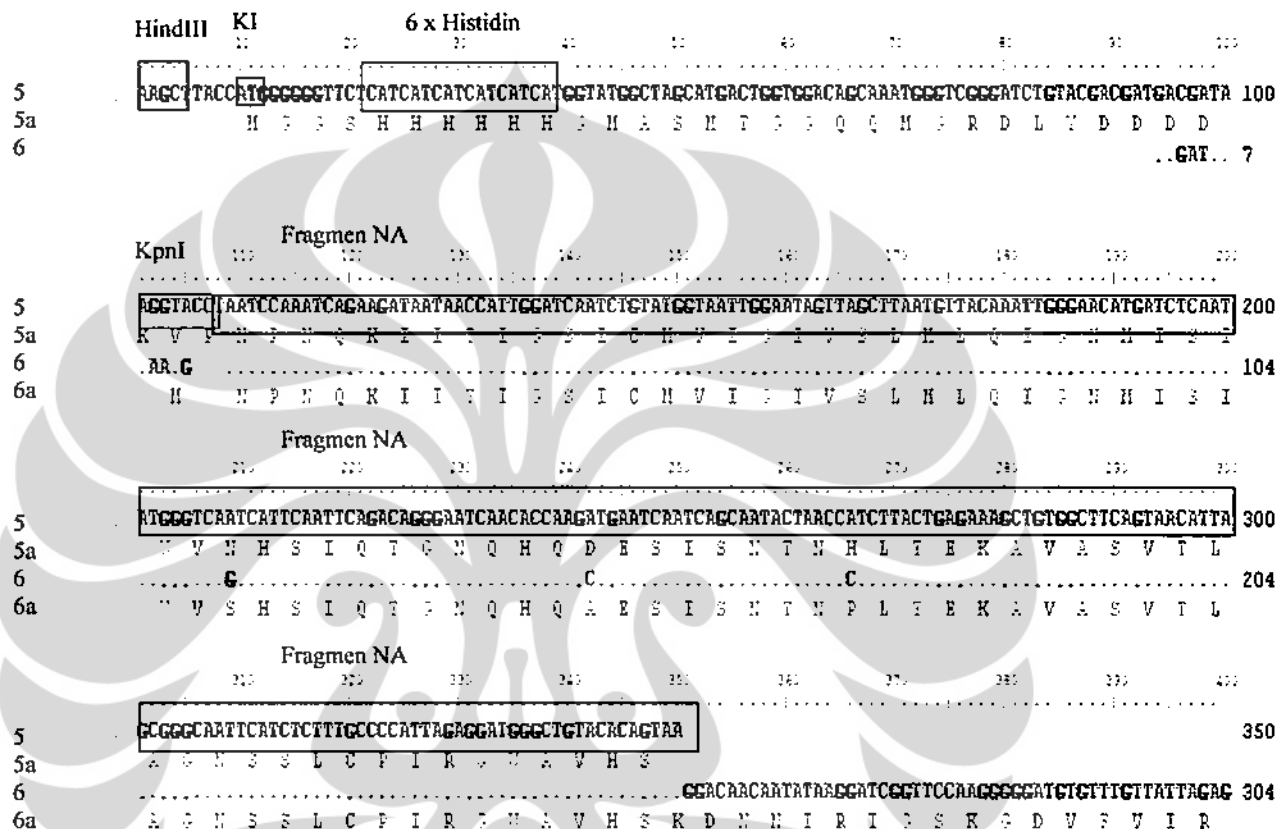
\* Sumber data diperoleh dari IHVCB.







Lampiran 3b: Arah orientasi serta susunan nukleotida [5] dan asam amino NA [5a] dari isolat ayam A/chicken/Indonesia/Jpf-001/07 (H5N1) hasil *sequencing* dengan primer N1R320 dalam klonasi pcDNA3.1/HisA-IRES MLV-NA-IRES-bsf -HIV-HA #6 dibandingkan dengan sekuen nukleotida [6] dan asam amino NA [6a] dari isolat manusia A/Indonesia/5/2005 (*gene bank#* EU146623; 2007).



#### Keterangan:

- HindIII : situs restriksi pada vektor pcDNA3.1/His A  
 KI : kodon inisiasi pada vektor pcDNA3.1/His A  
 6 x Histidin : *polyhistidine metal-binding tag* pada vektor pcDNA3.1/His A  
 KpnI : situs restriksi pada vektor pcDNA3.1/His A

Applied Biosystems

KlonA\_H1413F\_2009-04-23\_002

Inst Model/Name 3100/EIJKMAN\_INSTITUTE\_JAKARTA-18330-040

KlonA\_H1413F

Apr 23, 2009 05:12PM, GMT+07:00

KB\_3130\_POP7\_BDTV3.mob

Apr 23, 2009 05:26PM, GMT+07:00

Pls 2916 to 13860 Pk1 Loc:2891

Spacing:13.75 Pls/Panel1500

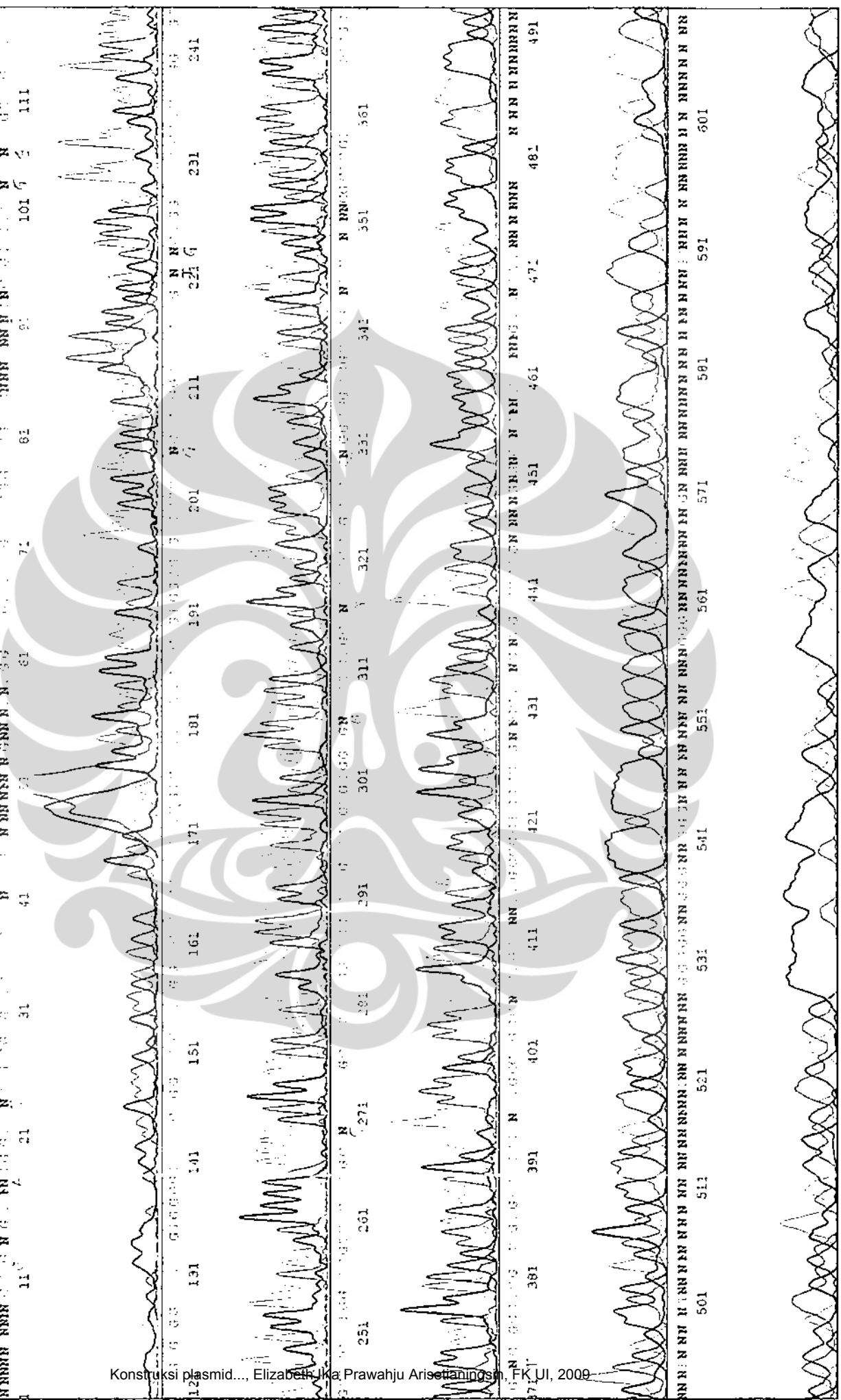
Version 5.2 Patch2 HISQV Bases: 393

Plate Name: seq\_23042009

S/N G:55 A:25 T:23 C:25

KB.bcp

KB 1.2 Cap:2



Konstruksi plasmid..., Elizabeth, Ika Prawahju Arisettaningih, FK UI, 2009

Lampiran 5: Homologi asam amino HA ( $\pm$  1700 pb) dari isolat ayam A/chicken/Indonesia/Jpf-001/07 (H5N1) [1] dibandingkan dengan asam amino HA Influenza A H5N1 isolat dari manusia A/Indonesia/5/2005 (*gene bank#* EU146622, 2007) [2]. ♣

```

          10          20          30          40          50
    .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
1  PGSFNDYEELKHLLSRINHFEKIQIIPKSYWPDHEASGEWSAACPYLGSP 50
2  PGSFNDYEELKHLLSRINHFEKIQIIPKSSWSDHEASSGVSSACPYLGSP 50

          60          70          80          90          100
    .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
1  SFFRNGVWLTKKNSTYPIIKKNYNNTNQEEDLLVLWGI RHPNDEEEEQTRLY 100
2  SFFRNVVWLIKKNSTYPTIKKSYNNTNQEEDLLVLWGI HHPNDAAEQTRLY 100

          110         120         130         140         150
    .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
1  QNPTTYISISIGTSTLNQRLVLPKIATR SKVNGQSXKD*VLLDNFKT**RNQL 150
2  QNPTTYISISIGTSTLNQRLVLPKIATR SKVNGQSXKDGVLLDNFKT**CNQL 150

          160         170         180         190         200
    .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
1  RE*WKFHCSRICIQNCQERGLSNEYK*IGIW*LQHQVSNSNGGDKL*YAI 200
2  RE*WKFHCSRICIQNCQERGLSNEYK*IGIW*LQHQVSNSNGGDKL*YAI 200

          210         220         230         240         250
    .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
1  PQHTPSHHRGMPQIREIKQISPCNRAQK*PSKREQKKKERTIWSYSRFYR 250
2  PQHTPSHHRGMPQICEIKQISPCNRAQK*PSKREQKKKERTIWSYSRFYR 250

          260         270         280         290         300
    .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
1  GRMAGNGRWLVWVPP*Q*AGEWVRCRQRIH SKGNRWSHQ*GQLNY*QNEH 300
2  GRMAGNGRWLVWVPP*Q*AGEWVRCRQRIH SKGNRWSHQ*GQLNH*QNEH 300

          310         320         330         340         350
    .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
1  SV*GCWKGI**LREENREFKQEDGRRVSGCLDL*CRTSGSHGK*ENSRLS 350
2  SV*GRWKGI**LRKENREFKQEDGRRVSRCLDL*CRTSGSHGK*ENSRLS 350

          360         370         380         390         400
    .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
1  *FKC*EPLRQGPTTA*G*CKGAG*RLFRVLSQM**WMYGKYKKNRVQLSA 400
2  *LKC*EPLRQGPTTA*G*CKGAG*RLFRVLSQM***MYGKYKKNRVQLSA 400

          410         420         430         440         450
    .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
1  VFRRSIIKKRGNKWGKTGINRNLPNIVNLFNSGEFPSTGNHDSWSIFMDV 450
2  VFRRSIIKKRGNKWGKIGINRNLPTVNLNLFNSGEFPSTGNHDGWSIFMDV 450

```

460

```

.....|.....|.....|.....|
1 LQWIVTMQNLHYKLGPV* 468
2 LQWIVTMQNLHXXKFVXXVQ 468

```

10

20

30

40

50

```

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
1 TVVSSITNVIMDVWKV*ETERTTIRSIQKKQD*KERK*VG*NWNQ*ELT 50
2 TVVSSITNVIMNVWKV*ETERTTIRSIQKKQD*KERK*VG*NWNQ*ELT 50

```

60

70

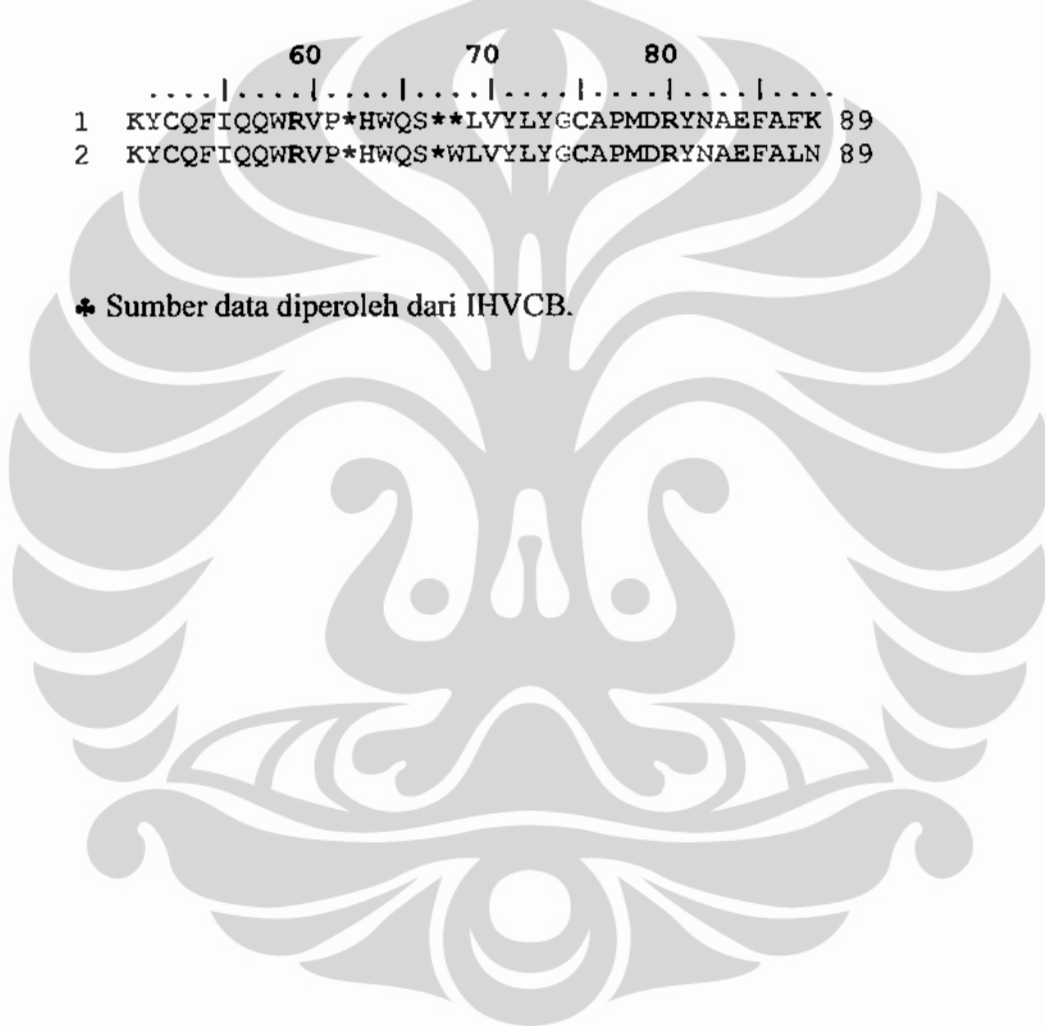
80

```

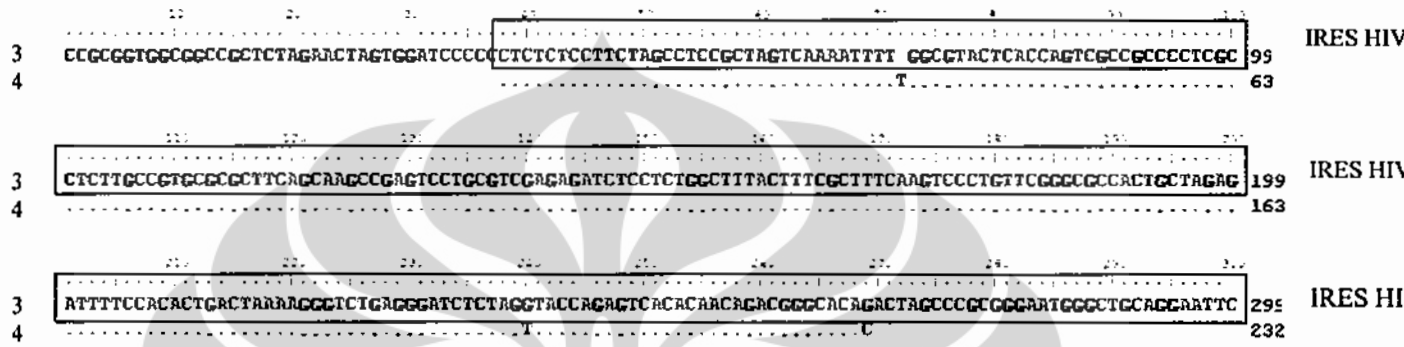
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
1 KYCQFIQQWRVP*HWQS**LVYLYGCAPMDRYNAEFAFK 89
2 KYCQFIQQWRVP*HWQS*WLVYLYGCAPMDRYNAEFALN 89

```

\* Sumber data diperoleh dari IHVCB.

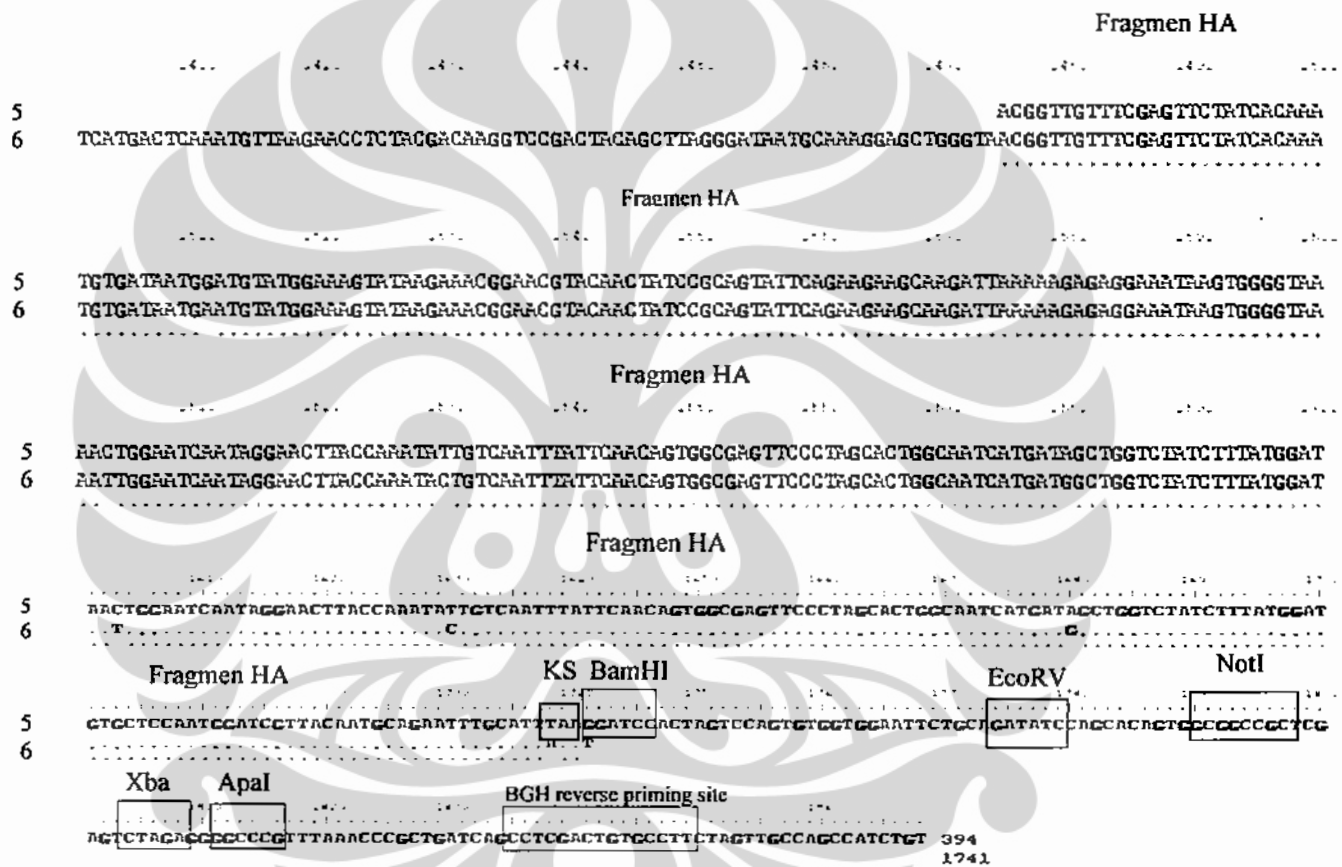


Lampiran 6a: Arah orientasi dan susunan nukleotida IRES HIV hasil *sequencing* dalam klonasi pKS-IRES HIV [3] dibandingkan dengan sekuen plasmid pNL4.3 (*gene bank* # AF324493; 2001) [4] ♣



♣ Sumber data diperoleh dari IHVCB.

Lampiran 6b: Arah orientasi dan susunan nukleotida fragmen HA dari isolat ayam A/chicken/Indonesia/Jpf-001/07(H5N1) hasil *sequencing* dengan primer H1413F dalam klon a pcDNA3.1/HisA-IRES MLV-NA-IRES-bsf -HIV-HA #6 [5] dibandingkan dengan sekuen HA Influenza A H5N1 isolat dari manusia A/Indonesia/5/2005 (*gene bank# EU146622, 2001*) [6]



Keterangan:

- KS : kodon stop pada fragmen HA  
 BamHI : situs restriksi pada vektor pcDNA5/FRT  
 EcoRV : situs restriksi pada vektor pcDNA5/FRT  
 NotI : situs restriksi pada vektor pcDNA5/FRT  
 Xba : situs restriksi pada vektor pcDNA3.1/His A  
 ApaI : situs restriksi pada vektor pcDNA3.1/His A  
 BGH reverse priming site : sekuen pada *multiple cloning site* pcDNA3.1/His A

## Sintesis Dan Pengklonaan Gen Ires *Human Immunodeficiency Virus* (HIV) Dan *Murine Leukemia Virus* (MLV) Ke Dalam Plasmid pBluescript KS(-)

E. Ika Prawahju A\*, Silvi Tri W\*, Sylvia Sance\*, Budiman Bela\*\*, Fera Ibrahim\*\*

\*Institute of Human Virology and Cancer Biology the University of Indonesia (IHVCB-UI)

\*\*Department of Microbiology, Faculty of Medicine, University of Indonesia

**Abstrak:** Pada umumnya mRNA sel eukariot hanya mentranslasi satu macam protein, dimana proses translasi tergantung pada struktur *capping* pada bagian ujung 5' yang disebut *non translated region* (NTR). Hal ini berbeda dengan mRNA beberapa virus, seperti HIV, dimana proses translasi protein tidak melibatkan NTR, namun melalui *Internal Ribosomal Site* (IRES). IRES dapat digunakan untuk membentuk mRNA bisistronik yang dapat mentranslasi 2 macam protein yang berbeda. Penelitian ini bertujuan mensintesis dan mengklona gen IRES *Human Immunodeficiency Virus* (HIV) dan *Murine Leukemia Virus* (MLV) yang kelak akan digunakan untuk konstruksi vektor plasmid pengeksresi mRNA yang mengandung susunan nukleotida glikoprotein Hemagglutinin (HA) dan Neuraminidase (NA) virus influenza A H5N1. Fragmen DNA IRES HIV diperoleh melalui *polymerase chain reaction* (PCR) menggunakan primer spesifik dan pola cetak plasmid pNL43. DNA penyandi IRES MLV disintesis dengan menggunakan metode PCR mutagenesis untuk menghilangkan kodon inisiasi glikogag yang terdapat dalam IRES MLV, dengan menggunakan pola cetak plasmid pAMS. Penghilangan kodon inisiasi ini ditujukan supaya proses translasi glikoprotein dimulai dari inisiasi kodon gen yang disisipkan, dalam hal ini HA atau NA. Setelah dipurifikasi fragmen IRES tersebut secara terpisah diklona ke dalam plasmid pBluescript KS (-). Kebenaran hasil sisipan, IRES HIV dan MLV, diverifikasi dengan enzim restriksi dan reaksi PCR. Kebenaran susunan nukleotida akan dilihat dengan menggunakan sekuensing. Primer yang dirancang untuk amplifikasi IRES HIV dan untuk amplifikasi serta mutasi IRES MLV telah terbukti dapat menghasilkan fragmen 280 pb dan 410 pb yang diinginkan. Melalui proses seleksi dengan PCR dan analisis enzim restriksi beberapa plasmid diindikasikan mengandung IRES HIV dan MLV. Segmen-segmen penyandi IRES HIV dan MLV telah berhasil disintesis dan diklona ke dalam plasmid pBluescript KS (-). Klona-klona plasmid rekombinan yang diperoleh masih perlu diverifikasi dengan reaksi sekuensing.

**Kata kunci:** IRES, HIV, MLV, H5N1

**Abstract:** In general, the translation of the most eukaryotic mRNA occurred for only one kind of protein after scanning of the 5' end of cap structure which is a non translated region (NTR). In contrast, the mRNAs of some viruses, such as HIV, perform the process of protein translation without involving NTR, but they are driven by internal ribosomal entry site (IRES). Therefore, IRES can be used to obtain bicistronic mRNA for translation of two different proteins. The goal of the current work is to synthesize and clone DNA fragments containing the IRES genes of *Human Immunodeficiency Virus* (HIV) and *Murine Leukemia Virus* (MLV) genes to be used in construction of plasmid DNA for expression of mRNA containing nucleotide sequence of the Avian Influenza H5N1 *haemagglutinin* (HA) glycoprotein and *neuraminidase* (NA). The HIV IRES was obtained by PCR using specific primers and the pNL 4.3 plasmid DNA as template. The MLV IRES DNA was generated using mutagenesis PCR method to remove the glycoag initiation codon in the MLV IRES, using plasmid pAMS as template. The removal of initiation codon was intended for the translation process of the glycoprotein to start from the initiation codons of the HA and NA genes. After purification, both HIV IRES fragment and MLV IRES fragments were cloned into the pBluescript SK(-) vector separately. The confirmation of HIV IRES and MLV IRES were verified by restriction enzyme and PCR. The identity of the cloned fragments was proven by nucleotide sequencing. The HIV IRES and MLV IRES DNA fragments of respectively 280 bp and 410 bp were successfully synthesized. Plasmid clones containing the HIV IRES and MLV IRES DNA fragments were identified by PCR and enzyme restriction analysis. The DNA fragments containing the HIV IRES and the MLV IRES sequences have been synthesized and cloned into plasmid pBluescript KS(-). The recombinant plasmid clones that were obtained require further verification by DNA sequencing.

**Key words:** IRES, HIV, MLV, H5N1

## Pendahuluan

Sebagian besar mRNA sel eukariot berfungsi monosistronik dan mengandung struktur tudung m<sup>7</sup>GpppN pada ujung 5', dimana N dapat berupa salah satu nukleotida. Mekanisme translasi protein menggunakan mRNA monosistronik dengan struktur tudung pada ujung 5' hanya menghasilkan satu macam protein.<sup>2</sup> Untuk kelangsungan hidup sel mRNA dapat menggunakan bentuk alternatif inisiasi translasi yang berbeda dengan mekanisme translasi standar, yaitu tidak memerlukan nukleotida bertudung sebagai faktor inisiasi. Alternatif mekanisme inisiasi translasi yang digunakan, yaitu melalui IRES.<sup>1,3,4,5</sup> IRES merupakan sekuen yang berperan untuk mendukung proses inisiasi translasi dengan membawa ribosom secara langsung masuk ke dalam situs kodon inisiasi AUG tanpa melalui *scanning* struktur tudung pada ujung 5'. Selain itu, IRES digunakan untuk membentuk mRNA bisistronik yang dapat mentranslasi 2 macam protein yang berbeda.

Berdasarkan beberapa hasil penelitian telah diketahui adanya sekuen *cellular IRES* pada beberapa organisme (manusia, tikus, mencit, khamir, ayam, lalat, tumbuhan) dan *viral IRES* pada beberapa famili virus, antara lain Retroviridae, Flaviviridae, Picornaviridae, Poxviridae; sedangkan fungsi IRES dapat berbeda tergantung pada jenis organisme dan nama gen dimana sekuen IRES ditemukan.<sup>5</sup>

Dua macam IRES digunakan pada penelitian ini, termasuk dalam famili Retroviridae, dimana IRES HIV ditemukan pada virus HIV tipe I dari genus Lentivirus, sedangkan IRES MLV pada virus MLV dari genus Gammaretrovirus. Melalui mekanisme IRES, mRNA dapat melakukan proses translasi protein tanpa melalui mekanisme *scanning*.<sup>1,2</sup> Berdasarkan penelitian Brasey

et al pada tahun 2003, sekuen IRES HIV terdapat pada posisi nukleotida 104-336, yang terdiri dari *primer binding site* (PBS), *dimer initiation site* (DIS), *the major splice donor* (SD), *the core packaging signal* ( $\Psi$ ) dan *hairpin* yang mengandung kodon inisiasi AUG. Penelitian Berlioz dan Darlix pada tahun 1995 telah dibuktikan bahwa sekuen IRES MLV berada setelah sekuen *splicing donor* (SD) pada posisi 204 RNA genom. Genom RNA MLV diketahui dapat langsung melakukan sintesis dua protein yang berkaitan dengan protein *gag*. Protein tersebut adalah Pr65<sup>gag</sup> yang merupakan prekursor protein struktural pada inti virion, dan Pr75<sup>glyco-gag</sup> sebagai prekursor protein *gag* glikosilasi (gliko-gag) yang ditemukan pada permukaan sel yang diinfeksi MLV. Untuk mencegah terbentuknya protein gliko-gag oleh kodon inisiasi CUG pada posisi 355, maka dilakukan mutasi pada CUG. Mutasi pada kodon inisiasi gliko-gag (CUG 355) tidak mempengaruhi ekspresi protein *gag* yang dibentuk oleh kodon inisiasi *gag* (AUG 355).<sup>1</sup>

Tujuan penelitian ini adalah untuk mensintesis dan mengklona gen IRES HIV dan MLV yang kelak akan digunakan untuk konstruksi vektor plasmid pengeksresi mRNA yang mengandung susunan nukleotida glikoprotein Hemaglutinin (HA) dan Neuraminidase (NA) virus influenza A H5N1.

## Metode kerja

### Bahan amplifikasi, plasmid, vektor, dan sel hospes

Fragmen IRES diamplifikasi menggunakan enzim *Pfx platinum DNA polimerase*. Plasmid yang digunakan sebagai cetakan DNA untuk sintesis IRES HIV dengan reaksi *polymerase chain reaction* (PCR) adalah pNL 43 (diperoleh dari *Laboratorium Institute Pasteur*



Paris), sedangkan untuk sintesis IRES MLV dengan reaksi PCR digunakan pAMS(koleksi Departemen Mikrobiologi FKUI yang diperoleh dari *The Institute of Medical and Veterinary*, Adelaide, South Australia). Sebagai vektor pengklonaan adalah pBluescript KS (-) (Fermentas), sedangkan sel hospes digunakan untuk pengklonaan, yaitu *Escherichia coli* Top10.

#### Pembentukan dan amplifikasi fragmen IRES HIV dan IRES MLV

Pasangan primer IRESHIV *Forward* + IRESHIV *Reverse* (IRESHIVF + IRESHIVR) dirancang untuk pembentukan dan amplifikasi fragmen IRES HIV menggunakan cetakan DNA pNL 43, dengan ukuran ampikon 231 pb (pasangan basa). Pasangan primer F $\Delta$ CUG + IRESMLV R dan IRESMLV F + R $\Delta$ CUG dirancang untuk PCR mutagenesis kodon inisiasi gliko-gag MLV menggunakan cetakan DNA PAMS, dengan ukuran ampikon masing-masing 310 pb dan 160 pb. Pembentukan dan amplifikasi fragmen IRES MLV dengan *overlapping* PCR digunakan pasangan primer IRESMLV F + IRESMLV R dengan cetakan DNA campuran ampikon (F $\Delta$ CUG + IRESMLV R) dan (IRESMLV F + R $\Delta$ CUG) menghasilkan fragmen dengan ukuran 450 pb. Program PCR untuk amplifikasi IRES HIV adalah satu siklus inisiasi pada suhu 95°C selama 4 menit dan dilanjutkan dengan 35 siklus yang terdiri dari: denaturasi pada suhu 94°C selama 15 detik, *annealing* (penempelan) pada suhu 62,4°C selama 60 detik, pemanjangan pada suhu 68°C selama 30 detik, serta ekstensi pada suhu 68°C selama 10 menit. IRES MLV dilakukan dengan program PCR yang sama, kecuali proses penempelan pada suhu 57,2°C. Hasil PCR diverifikasi

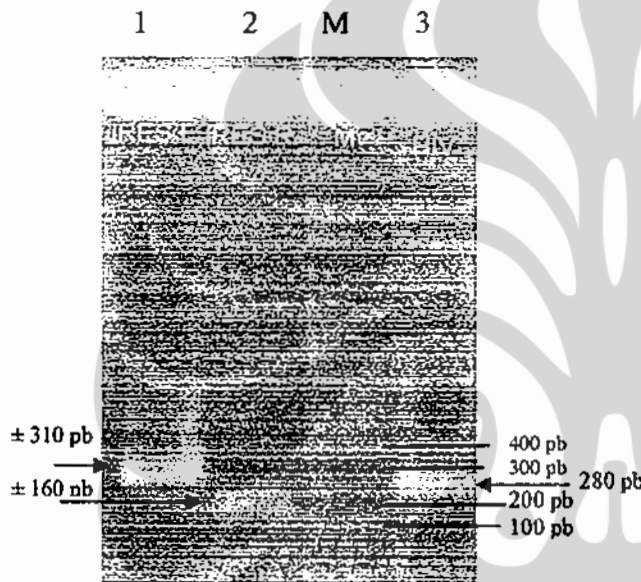
dengan menggunakan elektroforesis gel agarosa 1,5 %.

**Purifikasi fragmen IRES HIV dan IRES MLV.** Hasil amplifikasi fragmen IRES HIV dipurifikasi dengan PCR *purification kit* (Qiagen).<sup>6</sup> Fragmen IRES MLV dipotong menggunakan enzim restriksi HindIII, kemudian dielektroforesis dengan gel *Low Melting Agar* 1,2% (LMA) dan dipurifikasi dengan *Qiaex II purification kit* (Qiagen).<sup>6</sup>

**Pengklonaan IRES HIV dan IRES MLV.** Hasil purifikasi IRES HIV diligasi dengan vektor pBluescript KS (-) yang telah dipotong dengan enzim restriksi SmaI, sedangkan hasil purifikasi IRES MLV diligasi dengan vektor pBluescript KS (-) yang telah dipotong dengan enzim restriksi HindIII. Kemudian masing-masing hasil ligasi pKS-IRES HIV dan pKS-IRES MLV ditransformasi ke dalam sel hospes *E. coli* Top10 dengan metode *heat shock* CaCl<sub>2</sub> pada suhu 38°C. Sel *E. coli* Top 10 ditumbuhkan pada media agar *Luria Bertani* (LB) yang mengandung ampisilin 50  $\mu$ g/mL, isoprofil tiogalaktosidase (IPTG) dan X-gal untuk seleksi transforman. Seleksi transforman dilakukan dengan cara seleksi biru-putih, yaitu sel yang mengandung sisipan adalah koloni berwarna putih.<sup>7</sup> Selanjutnya, klon plasmid rekombinan diinokulasi pada media LB cair mengandung ampisilin 100 $\mu$ g/mL dan diinkubasi pada suhu 37°C selama satu malam. Kemudian kultur plasmid rekombinan diisolasi dan dipurifikasi sesuai dengan protokol Qiagen.<sup>6</sup> Identifikasi plasmid yang mengandung gen IRES HIV dan IRES MLV dilakukan dengan analisis menggunakan enzim restriksi endonuklease dan hasil pemotongan dilihat pada elektroforesis gel agarosa 1,5%.

**Hasil**

Fragmen IRES HIV berhasil diperoleh dengan menggunakan hasil rancangan pasangan primer IRESHIV F + IRESHIV R dan cetakan DNA pNL 4.3. Hasil analisis pada gel agarosa 1,5% menunjukkan bahwa fragmen IRES HIV dapat dihasilkan pita DNA spesifik dengan ukuran ampikon diantara pita DNA marka 200 pb dan 300 pb (gambar 1).



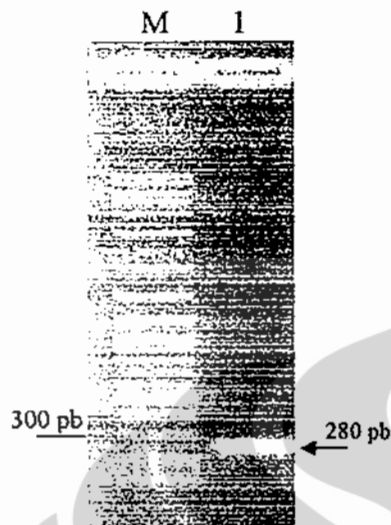
Gambar 1. Hasil amplifikasi fragmen IRES HIV dan IRES MLV (M :Marka 2 log; lajur 1: IRES F ( $\pm$  310 pb) hasil amplifikasi dengan primer MLVR +F $\Delta$ CUG; lajur 2: IRES R ( $\pm$  160 pb) hasil amplifikasi dengan primer MLVF+ R $\Delta$ CUG; lajur 3: fragmen IRES HIV hasil amplifikasi dengan primer HIVF +HIVR).

Fragmen DNA tersebut diperoleh setelah melalui proses optimasi menggunakan PCR, sehingga diperoleh program reaksi PCR seperti tercantum pada metode amplifikasi IRES HIV. Selanjutnya IRES HIV dipurifikasi menggunakan QIAquick PCR purification kit (Qiagen).<sup>6</sup> Pada gambar 2, dari hasil purifikasi juga terlihat pita DNA spesifik IRES HIV dengan

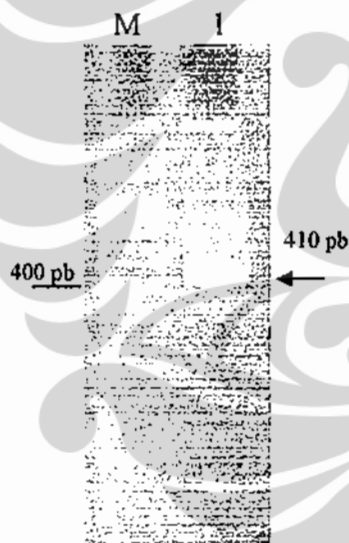
ukuran ampikon sesuai dengan yang diharapkan, yaitu 280 pb.

Kodon inisiasi gliko-gag (CUG) dihilangkan dengan menggunakan pasangan primer spesifik (F $\Delta$ CUG + IRESMLV R dan IRESMLV F + R $\Delta$ CUG) dan cetakan DNA PAMS setelah melalui proses optimasi pada reaksi PCR. Hasil amplifikasi yang dianalisis menggunakan elektroforesis gel agarosa 1,5% memperlihatkan pita DNA spesifik fragmen IRESF dengan ukuran ampikon diantara pita marka 100 pb dan 200 pb (160 bp) dan IRESR di atas pita marka 300 pb, yaitu 310 bp (gambar 1).

Fragmen IRES MLV telah diperoleh dengan mengamplifikasi campuran pasangan primer F $\Delta$ CUG + IRESMLV R dan IRESMLV F + R $\Delta$ CUG dengan menggunakan fragmen IRESF dan fragmen IRESR sebagai cetakan DNA, melalui metode *overlapping* PCR. Produk PCR yang diperoleh dianalisis dengan menggunakan elektroforesis gel LMA 1,2%, potongan pita DNA spesifik IRES MLV dipurifikasi dengan menggunakan QIAquick gel purification kit (Qiagen). Hasil purifikasi dianalisis dengan menggunakan elektroforesis gel poliakrilamid 12 % (pada gambar 3), menunjukkan pita DNA spesifik fragmen mutasi IRES MLV dengan ukuran di atas pita marka 400 pb, yaitu 410 pb.



Gambar 2. Hasil purifikasi fragmen IRES HIV dengan PCR purification kit (M : Marka 2 log; lajur 1: fragmen IRES HIV ukuran 280 pb)



Gambar 3. Hasil purifikasi fragmen IRES MLV dengan LMA (M: marka 2 log; lajur 1: fragmen IRES MLV ukuran 410 pb).

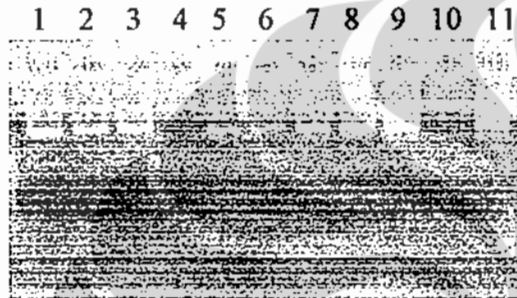
Fragmen sisipan DNA IRES HIV yang disisipkan ke dalam dengan vektor pBluescript KS (-) yang dipotong dengan enzim restriksi SmaI, sedangkan fragmen DNA IRES MLV disisipkan ke dalam vektor pBluescript KS (-) yang dipotong

dengan enzim restriksi HindIII. Kedua vektor pBluescript KS (-) yang masing-masing telah dipotong dengan enzim restriksi SmaI dan HindIII telah dianalisis pada elektroforesis gel agarosa 0,8% untuk mengetahui vektor telah terpotong sempurna. Selain itu, konsentrasi DNA IRES HIV, DNA IRES MLV dan ke dua vektor tersebut telah diukur dengan menggunakan spektrofotometer. Hal ini dilakukan agar proses ligasi dapat menghasilkan plasmid rekombinan yang diharapkan.

Transformasi dilakukan pada sel hospes *E. coli* Top 10 yang telah dibuat kompeten dengan larutan CaCl<sub>2</sub> dingin dengan metode *heat shock* pada suhu 38°C. Pada proses transformasi, sebagai kontrol transformasi digunakan *E. coli* yang ditransformasi dengan vektor pBluescript KS (-) tanpa sisipan. Kontrol negatif untuk melihat kontaminasi selama proses transformasi dan untuk melihat efektifitas kerja antibiotik digunakan kontrol *E. coli* kompeten yang tidak ditransformasi dengan plasmid. Untuk melihat kompetensi sel *E. coli* Top 10, digunakan kontrol positif dimana *E. coli* ditransformasi dengan plasmid yang sudah dioptimasi dengan sel kompeten. Setelah proses transformasi selama 16 jam diperoleh 18 koloni putih *E. coli* transforman yang mengandung plasmid rekombinan pKS-IRES HIV yang tumbuh. Pada kontrol negatif tidak ada koloni *E. coli* yang tumbuh. Hal ini menunjukkan bahwa tidak ada kontaminasi bakteri lain selama proses transformasi dan efektifitas kerja antibiotik pada media LB agar masih berfungsi dengan baik. Berdasarkan hasil pada kontrol positif memperlihatkan bahwa sel *E. coli* T.10 kompeten untuk proses transformasi DNA ke dalam sel.

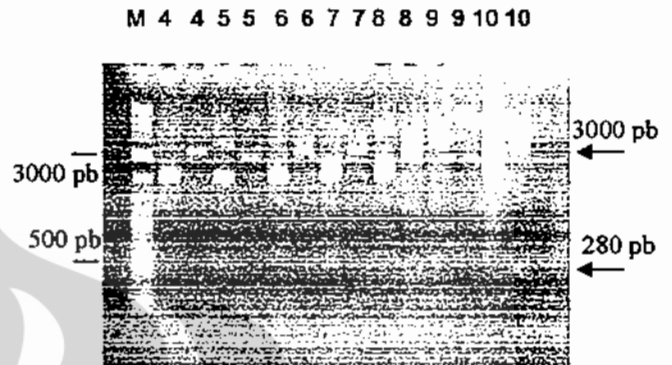
Sepuluh klon plasmid rekombinan pKS-IRES HIV yang tumbuh dikultivasi pada media LB cair mengandung

antibiotik. Hasil isolasi dan purifikasi plamid rekombinan pKS-IRES HIV yang dianalisis pada gel agarosa 0,8%, terlihat ada pita DNA dengan perbedaan pola migrasi antara plamid rekombinan dan plamid pBluescript KS (-) *wild type* (gambar 4), yang menunjukkan bahwa proses ligasi dan purifikasi berhasil dilakukan.



Gambar 4. Hasil isolasi plamid rekombinan pKS-IRES HIV (lajur 1: *Wild type* pBluescript KS(-) tidak mengandung DNA sisipan; lajur 2-11: koloni plamid rekombinan pKS-IRES HIV no. 1-10 diduga mengandung DNA sisipan fragmen IRES HIV (tanda →).

Verifikasi plamid yang mengandung gen IRES HIV telah dilakukan pemotongan menggunakan enzim restriksi SacII. Hasil pemotongan enzimatis dianalisis dengan menggunakan elektroforesis gel agarosa 1 % (gambar 5), dari 10 koloni yang diisolasi, ada 3 koloni, yaitu koloni nomor 5, 8 dan 10 yang menghasilkan 2 pita DNA berupa vektor pBluescript KS (-) dan sisipan DNA IRES HIV yang sesuai dengan ukuran yang diharapkan. Hal ini berarti koloni yang tumbuh mengandung sisipan DNA IRES HIV.



Gambar 5. Hasil pemotongan DNA rekombinan pKS-IRES HIV dengan enzim restriksi SacII (M: Marka 2 log; klon no. 4-10 (cetak tebal) pita DNA pKS-IRES HIV hasil pemotongan enzim; klon no. 5, 8, 10 menghasilkan pita DNA dengan ukuran 3000 pb dan 280 pb (tanda →; klon no. 4-10: pita DNA pKS-IRES HIV yang tidak dipotong).

### Diskusi

Proses optimasi fragmen DNA IRES HIV dan IRES MLV yang menggunakan teknik PCR diperlukan untuk mendapatkan pita DNA spesifik dengan ukuran ampikon 280 pb dan 410 pb. Optimasi tersebut dilakukan dengan cara membuat variasi suhu penempelan dan variasi  $MgCl_2$ , sehingga diperoleh suhu penempelan optimum untuk mendapatkan kedua fragmen tersebut. Pada fragmen IRES MLV terdapat kodon inisiasi CUG yang harus dihilang untuk mencegah terjadinya translasi gen glikogag. Gen glikogag akan mengganggu fungsi IRES dalam proses translasi protein yang diinginkan. Penelitian Berlioz et al, membuktikan bahwa mutasi pada kodon inisiasi gliko-gag (CUG 355) tidak mempengaruhi ekspresi protein gag yang dibentuk oleh kodon inisiasi gag (AUG 355).<sup>1</sup> Penghilangan kodon inisiasi dilakukan dengan menggunakan primer