

# PURIFIKASI PROTEIN REKOMBINAN DARI KLON GEN GAG-CA SEBAGAI KANDIDAT VAKSIN VIRUS PENYAKIT JEMBRANA

**Dwi Susilowati Soyi**

Fakultas Sains dan Teknologi, Universitas 'Aisyiyah Yogyakarta;

Email: [dwi.soyi@gmail.com](mailto:dwi.soyi@gmail.com)

**Asmarani Kusumawati**

Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Gadjah Mada

## **Abstract**

Jembrana disease is an acute disease which attack Bali cattle. The disease was caused by a Lentivirus, a member of Retroviridae family and subfamily Lentiviridae, which was called as Jembrana Disease Virus (JDV). Protein vaccine candidate for the disease constructed by inserting gag-ca gene that encodes capsid protein (CA) to a prokaryotic expression vector, pGEX-2T. The aim of the research is: to get pure CA protein from clone expression of gag-ca gene through purification with affinity column and cleavage with protease thrombin. To construct the protein vaccines was examine by these procedures: recombinant protein isolation, cleavage of fusion protein by using protease thrombin. The result showed that pure capsid protein can be obtained through purification with affinity column using MicroSpin GST and cleavage using protease thrombin.

**Keywords:** Jembrana disease virus (JDV), protein vaccine, gag-ca gene, protein purification

## **PENDAHULUAN**

### **Latar Belakang**

Ternak sapi merupakan salah satu sumber penghasil bahan makanan berupa daging yang memiliki nilai ekonomi tinggi dan penting artinya di dalam kehidupan masyarakat, karena daging sangat bermanfaat bagi pemenuhan gizi berupa protein hewani. Salah satu jenis sapi yang potensial untuk memenuhi kebutuhan protein hewani di Indonesia ialah sapi Bali (*Bos javanicus*). Hal ini dikarenakan sapi Bali merupakan satu-satunya sapi Indonesia yang mempunyai prosentase pematangan yang cukup tinggi dan mempunyai prosentase tulang rendah, hampir menyamai ras-ras tipe

potong terkenal di luar negeri. Akan tetapi, dalam usaha peningkatan populasi sapi Bali ini terdapat kendala berupa penyakit akut yang dinamakan penyakit Jembrana.

Penyakit Jembrana ini ditemukan pertama kali pada tahun 1964 di Jembrana, Bali. Penyakit ini spesifik menyerang sapi Bali, namun juga dapat menginfeksi sapi Ongole (*Bos indicus*), sapi Friesian (*Bos taurus*), dan kerbau (*Bos bubalis*), walaupun tanda-tanda klinisnya kurang jelas dan efeknya lebih ringan (Soeharsono et al., 1995). Penyakit yang akut dan berat ini memiliki gejala-gejala klinis pokok sebagai berikut: peningkatan temperatur rektal yang persisten selama

sekitar 7 hari, lethargy, anorexia, diare dengan darah pada feces.

Pada sapi eksperimental, angka kematian mencapai sekitar 17% (Soesanto et al., 1990). Penyebab penyakit Jembrana adalah suatu Lentivirus, yang disebut virus penyakit Jembrana atau Jembrana disease virus (JDV) yang merupakan anggota dari famili Retroviridae (Kertayadnya et al., 1993), dan lebih khusus merupakan anggota sub famili Lentiviridae (Chadwick et al., 1995a). Salah satu alternatif untuk mencegah penyebaran penyakit ialah dengan melakukan vaksinasi. Efektivitas vaksin didasarkan pada kemampuannya untuk menstimulasi respon imun adaptif. Oleh karena itu, vaksinasi harus diarahkan untuk menginduksi sistem imun, baik sistem imun humoral maupun seluler.

Vaksin dapat dikategorikan aman jika mengacu pada tidak terdapatnya peluang untuk terjadinya virulensi bahan vaksin dalam tubuh individu yang divaksinasi maupun pengaruh negatif lainnya sebagai efek samping pasca vaksinasi. Sampai saat ini, belum didapatkan vaksin yang efektif terhadap virus penyakit Jembrana (JDV). Satu-satunya vaksin terhadap JDV adalah virus yang dilemahkan dengan menggunakan Triton X-100 (Hartaningsih et al., 2001).

Berdasarkan hasil penelitian, protein capsid (CA) dari gen gag memiliki potensi untuk digunakan sebagai vaksin (Burkala et al., 1998; 1999). Protein CA merupakan protein utama virus yang merupakan antigen imunodominan dan bersifat imunogenik. Antibodi anti-CA masih ditemukan pada serum sapi 8 minggu setelah infeksi dan masih terus

ada sampai 59 minggu setelah infeksi (Hartaningsih et al., 1994). Adanya antibodi anti-CA pada serum sapi yang terinfeksi virus penyakit Jembrana menunjukkan bahwa protein tersebut mempunyai sifat imunogenik. Dengan demikian, protein CA dari virus penyakit Jembrana sangat potensial untuk dikembangkan sebagai calon vaksin yang efektif untuk penyakit Jembrana.

Beberapa riset terdahulu sudah mulai mengkonstruksi calon vaksin protein rekombinan dari virus penyakit Jembrana. Dalam penelitian sebelumnya (Kusumawati et al., 2003a), gen protein antigenik subunit CA dari gag yang dimasukkan ke dalam suatu vektor ekspresi prokariot (pGEX2T) ternyata dapat diekspresikan secara optimal sebagai protein rekombinan di E.coli BL21. Tentunya, penelitian tersebut perlu dikembangkan lebih lanjut dengan melakukan isolasi dan purifikasi protein CA.

## **Masalah**

Berdasarkan latar belakang di atas, maka rumusan masalah dalam penelitian ini ialah sebagai berikut: Apakah protein CA murni hasil ekspresi klon gen gag-ca dapat diisolasi melalui purifikasi dengan kolom afinitas dan pemotongan dengan Thrombin Protease?

## **Tinjauan Teori**

### **1. Penyakit Jembrana**

Pada akhir tahun 1960-an, apa yang sekarang dikenal sebagai penyakit Jembrana telah membunuh sekitar 60.000 ekor sapi Bali (*Bos javanicus*). Sejak saat itulah, beberapa kasus penyakit ini telah dilaporkan. Sampai sekarang, penyakit ini dikenali sebagai endemik yang terjadi

di beberapa tempat tertentu, termasuk di antaranya ialah pulau Bali (Brownlie, 1999). Dalam perkembangannya, penyakit ini juga menyerang beberapa jenis sapi yang lain, seperti sapi Ongole (*Bos indicus*), sapi Friesien (*Bos taurus*), dan kerbau (*Bos bubalis*), walaupun tanda-tanda klinisnya kurang jelas dan efeknya lebih ringan (Soeharsono et al., 1995).

Penyakit Jembrana telah menyebar ke pulau-pulau lain di Indonesia, seperti Sumatera, Jawa, dan Kalimantan. Hal ini kemungkinan disebabkan perpindahan secara illegal sapi Bali yang terinfeksi dari area yang merupakan daerah endemik penyakit ini (Soeharsono, 1997).

## 2. Gejala Klinis Penyakit Jembrana

Pada sapi Bali, masa inkubasi penyakit ini pendek, berkisar antara 5-12 hari. Gejala klinis yang utama adalah sebagai berikut: demam, lethargy, anorexia, dan pembengkakan nodus limpha superficial. Pada sapi eksperimental, angka kematian akibat penyakit ini bisa mencapai 17%. Pada sapi yang sudah sembuh, virus penyakit Jembrana masih terdeteksi dalam darah 2 tahun setelah infeksi (Soesanto et al., 1990). Pada sapi yang telah sembuh dari penyakit ini masih potensial sebagai sumber penularan penyakit bagi sapi-sapi yang lain.

Penyakit Jembrana menyebabkan perubahan haematologis pada sapi yang terinfeksi: leukopenia (sebagai akibat dari limfopenia, eosinopenia, dan neutropenia), thrombocytopenia, anemia, peningkatan konsentrasi urea dalam darah, dan penurunan konsentrasi protein plasma. Semua perubahan ini, secara prinsip, terjadi selama periode febril (Soesanto, et al., 1990). Perubahan patologis juga

terjadi, termasuk kerusakan vaskular, seperti haemorrhagic, tetapi perubahan yang paling khas ialah lymphadenopathy dan splenomegaly. Perembesan proliferasi lymphoid juga ditemukan pada sebagian besar organ parenchyma, terutama hati dan ginjal. Perembesan yang mengandung sel-sel macrophage terproliferasi juga ditemukan di paru-paru (Dharma et al., 1991).

## 3. Deteksi Penyakit

Dengan teknik hibridisasi in situ pada binatang percobaan, pada awalnya, virus penyakit Jembrana ditemukan di banyak sel pada berbagai jaringan, seperti limpa, nodus limpatikus, paru-paru, sumsum tulang, hati, dan ginjal. Hal ini sesuai dengan viraemia yang sangat tinggi pada peredaran darah selama fase febril. Sel yang terinfeksi juga diidentifikasi pada sirkulasi umum dan pada lesi intravaskuler di paru-paru (Chadwick et al., 1998). Selama kejadian akut, virus penyakit Jembrana dapat dideteksi pada air liur dan air susu sapi. Penularan terjadi secara langsung dengan kemungkinan melalui conjunctival, intranasal, dan mulut. Pada kejadian akut, titer virus sangat tinggi, tetapi menurun setelah 60 hari kejadian, dan virus tidak lagi dapat dideteksi pada cairan sekresi (Soeharsono et al., 1995).

Dengan teknik western immunoblotting, sera binatang yang terinfeksi bereaksi terhadap berbagai protein virus, seperti protein 100 kDa, 45 kDa, 42 kDa, 33 kDa, 26 kDa, 16 kDa, dan 14 kDa (Dharma et al., 1994). Khusus protein capsid (26 kDa) juga dikenali oleh sera binatang yang terinfeksi oleh bovine immunodeficiency virus (BIV). Protein-protein tersebut, dengan demikian,

memiliki epitop immunogenik dengan konservasi tinggi pada virus penyakit Jembrana dan BIV (Burkala et al., 1998). Protein capsid rekombinan 26 kDa dapat digunakan sebagai antigen untuk deteksi virus dengan teknik enzimelinked immunosorbent assay (ELISA) dan western immunoblotting. Dengan adanya reaksi silang antara virus penyakit Jembrana dan BIV, maka protein ini dapat digunakan untuk mendeteksi kedua jenis virus tersebut (Burkala et al., 1999).

#### **4. Virus Penyakit Jembrana (Jembrana Disease Virus/JDV)**

Dalam jangka waktu yang lama, penyebab penyakit Jembrana ini menjadi sebuah kontroversi. Akan tetapi, setelah proses penelitian yang panjang ditemukan bahwa penyebab penyakit ini adalah virus. Penyebab penyakit Jembrana diidentifikasi sebagai suatu lentivirus yang dinamakan virus penyakit Jembrana atau Jembrana disease virus (JDV). Lentivirus ini merupakan subfamili dari famili retroviridae.

Secara umum, retrovirus mempunyai sifat-sifat sebagai berikut: virion membulat beramplop; berdiameter 80-130 nm; mempunyai peplomer dengan panjang 8 nm; dan mempunyai struktur 3 lapis yang unik. Lapisan tengah merupakan kompleks genom-nukleoprotein yang meliputi sekitar 30 molekul reverse transcriptase dan mempunyai kesimetrian heliks. Struktur ini terbungkus oleh capsid ikosahedral yang selanjutnya dikelilingi oleh amplop yang berasal dari membran sel inang, dan dari sini mencuat peplomer glikoprotein (Fenner, 1990; Kakoma, 1988).

Genom dari retrovirus utuh mengandung 3 gen utama masing-masing

menyandi 2 atau lebih polipeptida. Gen gag (singkatan dari group-specific antigen) menyandi protein inti virion (capsid). Gen pol menyandi reverse transcriptase (polimerase), dan gen env menyandi protein peplomer virion (envelope). Retrovirus menjadi tidak aktif oleh pelarut lemak dan deterjen, dan oleh pemanasan pada suhu 56°C selama 30 menit. Akan tetapi, mereka lebih tahan terhadap sinar ultraviolet dan radiasi sinar X daripada virus lain, mungkin karena genomnya diploid (Fenner, 1990; Kakoma, 1988).

Sementara itu, lentivirus sebagai salah satu genus dalam famili retroviridae berbeda dengan retrovirus lainnya dalam struktur detail genomnya. Ia mengandung beberapa daerah pengatur yang tidak dijumpai pada retrovirus lain, dan dalam morfogenesis dan morfologi virion-nya. Membran plasmanya sangat menebal pada tempat penguncupan, dan nucleocapsid dalam virion dewasa terlihat sebagai silinder padat, seringkali dengan penumpukan materi pekat elektron pada satu ujungnya. Protein internal dari lentivirus yang berbeda (produk-gen gag dan pol) menunjukkan reaktivitas-silang, tetapi tidak bereaksi silang dengan protein setara dari retrovirus yang lain. Secara umum, lentivirus menyebabkan penyakit kronis penting pada domba, kambing, dan kuda. Genus ini juga meliputi virus immunodeficiency pada manusia, sapi, kucing, dan simian (Fenner, 1990; Kakoma, 1988).

Secara umum, partikel virus mengandung RNA, dan mempunyai singlestranded RNA (ss-RNA) linear sepanjang 7-10 kb. Partikel virus memiliki berat molekul  $4,6-6,6 \times 10^6$  genom virus, asam nukleat berbentuk monomer akan diikat bersama dengan ikatan hidrogen,

terdapat poliadenilasi pada ujung 3' dan adanya capping pada ujung 5'. Protein lipid mengandung sekitar 35% lipid dan karbohidrat sekitar 3,5% yang berasosiasi dengan protein envelope (Harper, 1993).

Dalam konteks virus penyakit Jembrana, urutan asam nukleat lengkap genom virus Jembrana yang terdiri atas ss-RNA sudah ditentukan (Chadwick et al., 1995). Genom tersebut terdiri atas 7732 basa, kecuali gen-gen untuk gag, pol, env, dan LTR (long terminal repeat) yang merupakan karakter retrovirus. Genom virus penyakit Jembrana juga memiliki gen tambahan (accessory), termasuk tat dan rev, yang khas pada lentivirus. Gen gag berfungsi menyandi struktur protein internal, yaitu protein capsid, matrix, dan nucleocapsid. Gen pol berfungsi menyandi enzim-enzim untuk replikasi virus, yaitu protease, reverse transcriptase, dan integrase. Gen env mengkode protein envelope yang terdiri dari protein surface unit dan transmembrane (Watson et al., 1983; Paoletta, 1995; Wilcox, 2001).

### 5. Vaksin Protein Rekombinan

Dalam perkembangan terakhir, upaya untuk memproduksi vaksin yang lebih stabil telah difokuskan pada analisis yang mendetail tentang respon imun pada berbagai penyakit infeksius dalam rangka mengidentifikasi sisi antigenik pada patogen, termasuk menstimulasi imunitas protektif. Salah satu yang diperkembangkan berkaitan dengan kerangka ini ialah vaksin protein rekombinan dari partikel virus.

Vaksin protein rekombinan merupakan vaksin yang sangat potensial dikembangkan dewasa ini, karena vaksin ini bisa memacu timbulnya antibodi yang dapat berinteraksi dengan protein

antigen atau partikel virus (Taboga et al., 1997). Dengan demikian, vaksin model ini merupakan vaksin yang menjanjikan untuk mengontrol penyakit yang disebabkan oleh virus.

Ada beberapa keuntungan vaksin protein rekombinan ini. Pertama, protein rekombinan lebih stabil, dan dalam strukturnya tidak mengandung materi-materi yang bisa menginfeksi (Robinson et al., 2003). Kedua, vaksin ini didesain untuk menstimulasi respon imun protektif terhadap sisi spesifik pada antigen, sekaligus juga menstimulasi imunitas secara lebih luas pada strain atau serotipe yang berbeda dari patogen dengan menggunakan modifikasi tertentu (Ijaz et al., 1991; Barnett et al., 1996). Ketiga, vaksin ini juga memberikan peluang untuk memperkuat respon imun dengan menggunakan adjuvan. Hal ini tidak bisa digunakan pada vaksin konvensional akibat kondisinya yang labil (Partidos et al., 1997). Dan keempat, vaksin ini juga efektif digunakan melalui rute intranasal (Delmas et al., 1996; Partidos et al., 1996 dan 2001), mulut (Jones et al., 1997), dan transdermal delivery (Partidos et al., 2001; Beignon et al., 2001). Selain itu, protein antigen dapat digunakan sebagai suatu vaksin yang potensial karena dapat dibuat untuk mengembangkan antigen yang spesifik sebagai perlindungan melawan penyakit dan infeksi. Protein dapat menyebabkan aktifnya respon imun dan dapat dikenali oleh sel-T. Beberapa laporan menyatakan bahwa imunitas sel-T dapat ditingkatkan dengan memasukkan suatu protein antigen ke dalam tubuh. Penemuan ini membuka kemungkinan untuk menggunakan protein sebagai sebuah vaksin yang

aman. Protein mempunyai kemampuan untuk menginduksi adanya imunitas dan toleransi (Ogra et al., 2001). Vaksin protein mempunyai sedikit masalah, yaitu bahwa protein kadangkadang tidak mempunyai daya imunogenitas kuat dan hal ini akan sulit untuk membangkitkan respon spesifik MHC klas I melalui imunisasi dengan protein. Salah satu pendekatan untuk memecahkan masalah tersebut adalah dengan mengintegrasikan suatu protein dengan menggunakan rekayasa genetik menjadi carier protein dalam suatu vektor virus (Jeneway et al., 2001).

Sampai saat ini, telah banyak vaksin protein rekombinan yang dikembangkan. Pada tahun 1982, protein rekombinan berhasil dikembangkan dari protein virus pada foot and mouth diseases yang menginfeksi marmut sebagai hewan model di laboratorium (Bittle et al., 1982; Pfaff et al., 1982). Penemuan ini didukung pula dengan adanya imunitas protektif pada sapi dan babi (DiMarchi et al., 1986; Broekhuijsen et al., 1987). Imunitas protektif yang sama juga ditunjukkan pada binatang (Langweld et al., 1994; Loangeveld et al., 1995). Model vaksin yang sama juga dikembangkan untuk melawan canine parvovirus (CPV) pada binatang (Casal et al., 1995).

## 6. Kromatografi Afinitas

Protein rekombinan yang akan digunakan sebagai calon vaksin untuk penyakit Jembrana terlebih dahulu diisolasi dan dipurifikasi dengan menggunakan kromatografi afinitas. Kromatografi afinitas telah dikembangkan sejak tahun 1960-1970. Pada awalnya, kromatografi afinitas

digunakan untuk imobilisasi natural ligand yang khususnya berinteraksi dengan protein yang dikehendaki. Ligand diimobilisasi pada partikel yang sesuai, dan kemudian dibuat menjadi sebuah kolom. Kolom ini akan secara spesifik mengikat protein yang diinginkan, sementara zat lain yang tidak dikehendaki tidak akan terikat dan akan keluar pada tahap pencucian. Teknik afinitas secara umum digunakan pada interaksi biospesifik yang digunakan untuk memisahkan suatu protein dari protein lainnya, tetapi juga untuk mempelajari, meneliti, atau menentukan interaksi protein-protein (Scopes, 1994).

Kromatografi afinitas mempunyai keunggulan dibandingkan dengan proses pemisahan molekul biologis lainnya, yaitu interaksi antara zat biologis yang diinginkan dengan ligan tidak akan menyebabkan perubahan pada molekul biologis, seperti titik isoelektrik (pI), hidrofobisitas ataupun bentuknya. Beberapa molekul biologis menggunakan kromatografi ini untuk pemisahannya, walaupun molekul tersebut mempunyai spesifikasi tertentu, misalnya bentuk yang spesifik (reseptor atau enzim), perubahan konformasi spesifik setelah adanya perubahan pH, atau bagian molekul penting yang dapat mengikat atau berinteraksi dengan molekul lain (epitop antibodi) (Deutscher, 1990).

Dalam vektor pGEX-2T, gen akan difusikan dengan gen GST (Glutathione S-Transferase) pada bagian 5', sehingga protein rekombinan yang disintesis dalam E.coli akan berfusi dengan GST pada bagian N-Terminal. Metode spesifik tidak ada untuk isolasi protein gag-ca. Berkat fusi ini, protein rekombinan akan dapat diisolasi dan dipurifikasi

dengan mudah dengan menggunakan kromatografi afinitas menggunakan Glutathione Sepharose. Elusi protein fusi dilakukan dengan reduced glutathione. Protein rekombinan dari Jembrana dapat dipotong dengan thrombin, baik dalam kolom maupun sesudah elusi. Konstruksi protein didesain sedemikian rupa, sehingga protein rekombinan non-fusi nantinya hanya memiliki 3 asam amino tambahan pada bagian N-terminal. Hal ini bertujuan agar struktur protein tetap struktur protein nativ dan tidak ada hambatan fungsi atau sifat imunogenitasnya (Kusumawati et al., 2003). Salah satu faktor yang harus diperhatikan dalam purifikasi agen imunisasi ialah metode purifikasi yang dipergunakan haruslah sesuai dengan hasil akhir yang diinginkan. Sebagai kaidah umum paling tidak dua metode yang memurnikan antigen atas dasar parameter yang berbeda harus dipakai secara berurutan. Hal tersebut meliputi kombinasi antara metode resolusi tinggi seperti isoelectrofocusing, chromatofocusing, high performance liquid chromatography, kromatografi afinitas dan gel elektroforesis poliakrilamid (Goding, 1986).

## **METODE DAN BAHAN PENELITIAN**

### **A. Bahan**

Bahan yang dipergunakan antara lain: *Escherichia coli* BL21; IPTG (isopropil- $\beta$ -d-thiogalaktopiranosida); Medium 2X YTA; ampicillin (untuk isolasi protein rekombinan); sodium dodecyl sulfate (SDS); phosphat buffer saline; larutan destaining; resolving gel 10%; stacking gel

3%; elektrode buffer; 4 x laemmli buffer; SIGMA marker protein low range (untuk SDS-PAGE); reduced glutathione, thrombin protease, dan phosphate buffer saline (untuk pemotongan protein fusi).

### **B. Alat**

Alat-alat yang dipergunakan antara lain: Elektrophoresis SDS-PAGE; Ependorf PlastibrandR (Brand GmbH, Germany); Tips untuk mikropipet (masing-masing 40-200  $\mu$ l dan 200-100  $\mu$ l); Sonikator Labsonic U (B. Bram, USA); Sentrifus Beckman J-6B (Smithkline Beckman Co., USA); Sentrifus Megafuge (Heraeus Sepatech GmbH, Germany); Freezer -70oC dan -20oC; Refrigerator; Spektrofotometer; Shaking inkubator; Waterbath dengan pengatur suhu; MicroSpin GST Columns Purification (Amersham Pharmacia Biotech); dan Laminar air flow.

### **C. Metode**

#### **1. Isolasi plasmid pGEX-CA dari E.coli DH5 $\alpha$ dengan High Pure Plasmid Isolation Kit (Roche)**

Beberapa klon hasil transformasi plasmid pGEX-CA ke dalam sel bakteri *E.coli* DH5 $\alpha$  dikultur pada medium LB cair baru yang mengandung ampicillin konsentrasi akhir 100  $\mu$ g/ml. Kultur diinkubasi pada suhu 37°C dengan penggojogan keras selama satu malam. Selanjutnya suspensi bakteri diambil untuk diisolasi plasmidnya dengan High Pure Plasmid Isolation Kit (Roche).

Kultur bakteri *E.coli* DH5 $\alpha$  yang mengandung pGEX-CA diambil sebanyak 4 ml untuk diambil peletnya dengan cara sentrifugasi 13.000 rpm selama 10 menit. Pelet diresuspensikan dengan 250  $\mu$ l buffer 1 (0,1 M Rnase A, 50

mM Tris-HCl dan 10 mM EDTA, pH 8,0), ditambahkan 250  $\mu$ l buffer 2 (0,2 M NaOH dan 1% SDS) dan dicampur dengan membolak-balik pada suhu kamar selama 5 menit. Dilanjutkan dengan penambahan 350  $\mu$ l buffer 3 (4 M Guanidin hidroklorid dan 0,5 M potasium asetat, pH 4,2) dicampur dengan membolak-balik, diinkubasi dalam es selama 5 menit. Supernatan diambil dengan cara sentrifugasi 13.000 rpm selama 10 menit. Supernatan yang didapat kemudian dimasukkan dalam 29 column tube High Pure Isolation Kit (Roche) dan dilanjutkan dengan sentrifugasi 13.000 rpm selama 60 detik. Ditambahkan 700  $\mu$ l buffer 5 (20 mM NaCl, 2 mM Tris-HCl pH 7,5) dalam column tube, sentrifugasi 13.000 rpm 60 detik sebanyak 2 kali. Column tube kemudian dipindahkan ke kolektor tabung bersih dan ditambahkan 50  $\mu$ l buffer elusi 6 (10 mM Tris-HCl, pH 8,5). DNA plasmid diekstraksi dengan melakukan sentrifugasi 13.000 rpm 60 detik. Hasil elusi merupakan plasmid DNA yang siap dianalisis ada tidaknya sisipan gen gag-ca di dalamnya.

## 2. Isolasi dan Amplifikasi Gen gag-ca dari Plasmid DNA dengan PCR

Untuk menganalisis ada tidaknya insert gen gag-ca dalam calon vaksin protein rekombinan (pGEX-CA) maka dilakukan isolasi dan amplifikasi gen gagca dengan metode PCR menggunakan primer spesifik.

PCR dilakukan dengan Pure Taq-Ready to Go PCR kit (Amersham Bioscience) dengan total volume reaksi sebanyak 25  $\mu$ l, yang terdiri dari: 2  $\mu$ l DNA template (konsentrasi 10-20 pg/ $\mu$ l), masing-masing 1  $\mu$ l forward primer dan

reverse primer (konsentrasi 20 pmol/ $\mu$ l) dan 21  $\mu$ l aquades steril. Reaksi PCR dalam mesin thermocycler dilakukan dengan kondisi sebagai berikut: denaturasi awal pada suhu 94°C selama 5 menit, 35 siklus reaksi terdiri dari: denaturasi (94°C, 40 detik), annealing (55°C, 40 detik), ekstensi (72°C, 1 menit 30 detik), ekstensi tambahan pada suhu 72°C selama 10 menit. Setelah dilakukan reaksi PCR, sebanyak 6  $\mu$ l hasil PCR ditambah 2  $\mu$ l loading buffer dielektroforesis pada gel agarose 1% selama 60-90 menit (kekuatan listrik dengan tegangan konstan 30 100 Volt). Selanjutnya, hasil elektroforesis difoto dengan polaroid gel cam (Polaroid).

## 3. Kondisi Kultur Bakteri

Klon positif yang digunakan adalah pGEX-CA dalam E.coli BL21. Media kultur yang digunakan adalah 2X YTA (16 g/l tryptone; 10 g/l yeast ekstrak; 5 g/l Na Cl; pH 7) yang ditambahkan ampicillin sampai konsentrasi akhir 100  $\mu$ g/ml. Untuk induksi sintesis protein digunakan konsentrasi akhir IPTG 1 mM. Penambahan IPTG dilakukan pada saat OD 600 nm kultur mencapai sekitar 0,6. Suhu inkubasi kultur yang digunakan adalah 37°C dengan penggojogan keras.

## 4. Isolasi Protein Rekombinan

Starter untuk ekspresi dibuat dengan menginokulasikan klon pGEX-CA pada 5 ml media 2X YTA, ditambah ampicillin 100  $\mu$ g/ml, kemudian diinkubasi pada suhu 37°C dengan penggojogan keras selama semalam.

Untuk isolasi dan purifikasi protein, digunakan kondisi kultur dan induksi IPTG paling optimal sebagai

berikut: dari starter pGEX-CA kemudian diambil 2 ml dan ditambahkan pada 20 ml media 2X YTA yang mengandung ampicillin 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . Kultur kemudian diinkubasi pada suhu 37°C dengan penggojogan keras selama 4 jam. Penambahan IPTG konsentrasi akhir 1 mM dilakukan pada saat OD<sub>600nm</sub> kultur mencapai 0,6 (kira-kira 1 atau 2 jam setelah inokulasi). Pemanenan kultur dilakukan setelah masa inkubasi selama 4 jam pasca induksi IPTG.

### 5. Analisis Protein Rekombinan

Hasil inkubasi selama 4 jam setelah induksi IPTG 1mM kemudian diambil 20 ml untuk diambil pelet dengan sentrifugasi 3.000 rpm selama 15 menit pada suhu 4°C. Pelet yang diperoleh dicuci dengan PBS (Phosphat buffer saline) sebanyak 2 kali. Selanjutnya, pelet diresuspensikan dengan 1 ml PBS, dan kemudian dilakukan sonikasi pada sampel selama 30 detik sebanyak 4 kali untuk masing-masing sampel. Dilakukan sentrifugasi 3.000 rpm selama 15 menit pada suhu 4°C. Sebanyak 20  $\mu\text{l}$  lysate selanjutnya dicampur dengan volume yang setara dengan 4x Laemmli buffer dan dianalisis dengan SDS-PAGE dan elektroforesis dijalankan dengan 3,5 volt/cm panjang gel.

### 6. Purifikasi Protein

Purifikasi protein yang terdapat dalam lysate menggunakan MicroSpin GST Columns Purification (Amersham Pharmacia Biotech). Larutan Glutathione Sepharose 4B MicroSpin dalam kolom dicampur terlebih dahulu dengan cara memvorteknya. Tutup dilepaskan pada bawah kolom dan dilakukan sentrifugasi

2.000 rpm selama 1 menit supaya matriksnya mengendap di bawah kolom. Supernatan hasil isolasi protein diambil 600  $\mu\text{l}$  untuk dimasukkan dalam kolom MicroSpin GST. Sesudah dicampurkan dengan Glutathione Sepharose dari kolom, dilakukan inkubasi pada suhu kamar selama 10 menit untuk penempelan protein fusi GST. Dilakukan sentrifugasi 2.000 rpm selama 1 menit. Kolom dicuci dengan 600  $\mu\text{l}$  PBS 1X pH 7,3 sebanyak 3 kali dengan melakukan sentrifugasi 2.000 rpm selama 1 menit. Kolom kemudian dikeringkan pada kertas tisu bersih dengan mendiampkannya 5 menit pada suhu ruang. Selanjutnya, ditambahkan 100  $\mu\text{l}$  buffer elusi (50 mM Tris-HCl, 10 mM glutathione pereduksi, pH 8,0) dan dilakukan inkubasi pada suhu ruang selama 10 menit, kemudian dilakukan sentrifugasi 2.000 rpm selama 1 menit.

### 7. Pengukuran Kadar Protein dengan Biuret Protein Assay

Supernatan protein yang diperoleh diambil 4  $\mu\text{l}$  untuk kemudian ditambah dengan 796  $\mu\text{l}$  dH<sub>2</sub>O dan 200  $\mu\text{l}$  larutan Biuret. Dicampur dengan baik dengan vortex dan langsung dilakukan pengukuran absorbansi pada OD<sub>595nm</sub>.

### 8. Pemotongan Protein Fusi CA dengan Protease Thrombin

Protein CA yang diperoleh dari hasil purifikasi dengan menggunakan kolom MicroSpin merupakan protein yang masih berfusi dengan GST, sehingga diperlukan pemotongan dengan Thrombin Protease untuk mendapatkan protein yang murni ialah yang sudah terpisah dengan GST.

Pembuatan larutan thrombin dilakukan dengan melarutkan 500 unit

thrombin dalam 0,5 ml PBS (4oC), kemudian digojog sampai terlarut. Selanjutnya, larutan di-aliquot dan disimpan pada suhu -80oC. Untuk melakukan pemotongan protein fusi, dipersiapkan campuran 80  $\mu$ l larutan thrombin (1 unit/ $\mu$ l) dicampur dengan 920  $\mu$ l PBS.

Untuk pemotongan protein fusi CA dengan thrombin terlebih dahulu perlu dilakukan optimasi waktu inkubasi dan unit thrombin yang dipergunakan. Berdasarkan protokol dari Amersham Pharmacia disebutkan bahwa waktu inkubasi untuk pemotongan protein fusi menggunakan thrombin berkisar antara 2- 16 jam, sehingga dilakukan pemotongan protein fusi CA dengan perlakuan waktu inkubasi 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, dan 16 jam. Hasil pemotongan protein fusi dengan variasi waktu inkubasi ini kemudian dianalisis dengan SDS-PAGE 15% untuk mengetahui profil protein yang dihasilkan, berdasarkan hasil optimasi tersebut akan dipilih waktu inkubasi yang optimal.

Untuk unit thrombin yang diperlukan dalam pemotongan protein fusi CA ini juga dilakukan optimasi waktu inkubasi, dalam optimasi ini dipergunakan perlakuan unit thrombin 0, 2, 4, 6, 8, dan 10 unit. Hasil pemotongan protein fusi dengan variasi unit thrombin ini selanjutnya dianalisis dengan SDS-PAGE 12,5% untuk menentukan unit thrombin yang memberikan hasil pemotongan yang optimal.

### **9. Pengukuran Konsentrasi Protein CA dengan Biuret Assay**

Supernatan protein hasil pemotongan dengan thrombin (protein

CA murni), diambil 4  $\mu$ l untuk kemudian ditambah dengan 798  $\mu$ l dH<sub>2</sub>O dan 200  $\mu$ l larutan Biuret. Dicampur dengan baik dengan vortex dan langsung dilakukan pengukuran absorbansi pada OD595 nm.

## **HASIL DAN BAHASAN**

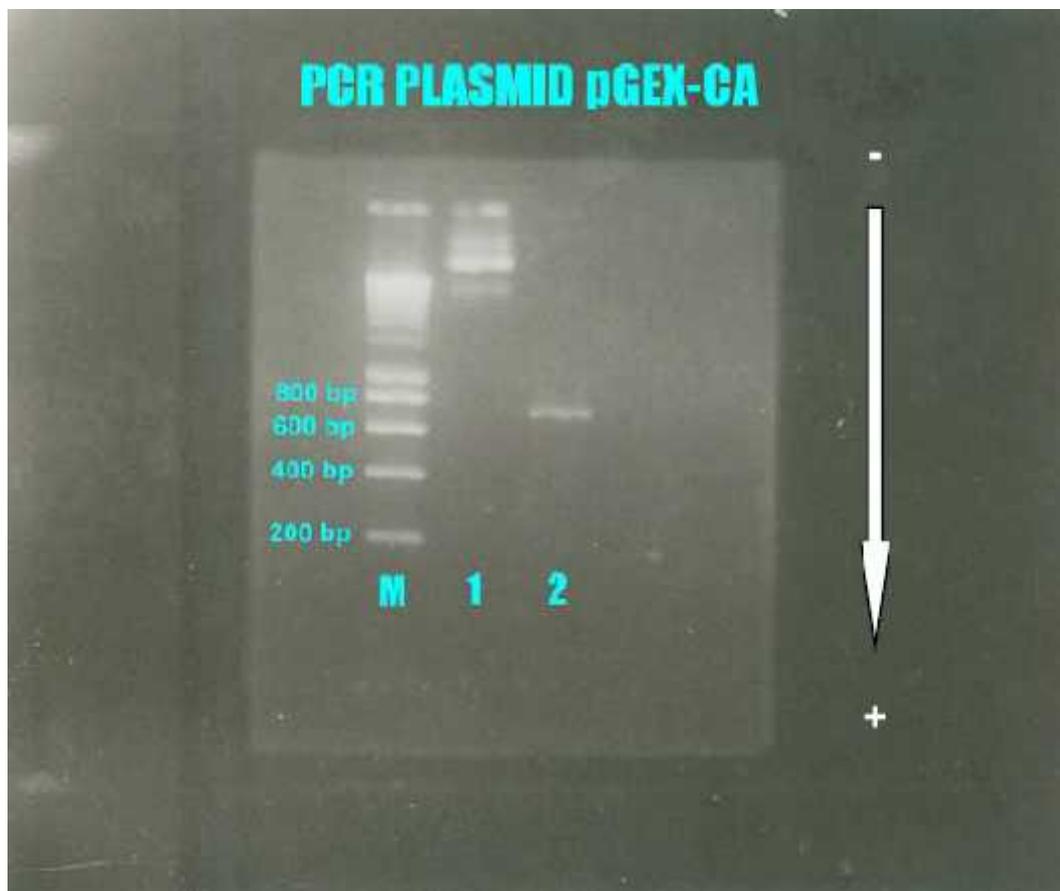
Pada penelitian sebelumnya, gen gag-ca sebagai calon vaksin protein, pada awalnya, diisolasi langsung dari limpa sapi Bali yang positif terinfeksi virus penyakit Jembrana. Gen gag-ca diisolasi dengan metode RT-PCR satu tahap dengan menggunakan primer spesifik untuk gen gag-ca. Proses ini dilanjutkan dengan kloning dalam plasmid pCR 2.1 TOPO (Invitrogen). Hasil kloning ini dipotong dengan enzim BamHI dan EcoRI, dan diligasi dengan plasmid pGEX-2T yang juga dipotong dengan enzim BamHI dan EcoRI, sehingga diperoleh hasil ligasi, yaitu plasmid pGEX-CA. Selanjutnya, plasmid ini ditransformasikan ke dalam E.coli BL21. Gen gag-ca di dalam plasmid pGEX-CA telah disekuen. Gen gag-ca ini terdiri dari 684 nukleotida, termasuk tambahan kodon inisiasi (ATG) dan kodon terminasi (TAG) yang disisipkan dalam konstruksi plasmid pGEX-CA (Kusumawati et al., 2003b). Selanjutnya, untuk menganalisis apakah plasmid pGEX-CA ini membawa insert gen gag-ca dilakukan dengan metode PCR menggunakan primer spesifik untuk gen gag-ca. Oleh karena penelitian ini merupakan lanjutan dari penelitian sebelumnya, maka perlu dilakukan pengecekan ulang terhadap plasmid pGEX-CA dengan tujuan untuk memastikan bahwa plasmid rekombinan masih membawa insert gen gag-ca.

Dengan demikian, penelitian ini diawali dengan teknik PCR menggunakan primer spesifik untuk gen gag-ca.

#### A. Polymerase Chain Reaction (PCR)

PCR dilakukan untuk memastikan bahwa plasmid rekombinan masih membawa insert gen gag-ca. PCR dilakukan dengan mengacu pada

prosedur yang telah dilakukan sebelumnya (Kusumawati et al., 2002a). Primer yang digunakan juga memiliki sekuen yang sama dengan penelitian sebelumnya (Kusumawati et al., 2002a). Dari proses PCR yang dilakukan dalam penelitian ini diperoleh hasil seperti pada **Gambar 1**.



**Gambar 1.** Hasil PCR terhadap plasmid rekombinan pGEX-CA.  
(M): Marker; (1): plasmid pGEX-CA; (2): gen gag-ca.

Dari Gambar 1 dapat dijelaskan bahwa hasil PCR dengan template pGEXCA menunjukkan gen gag-ca berhasil diisolasi dan diamplifikasi dengan munculnya pita DNA yang jelas. Forward primer dalam reaksi PCR menempel pada template DNA, ialah

mulai 9 basa di depan ORF gag-ca dalam konstruksi pGEX-CA, sementara reverse primer menempel mulai 9 basa di belakang ORF gag-ca di dalam konstruksi pGEX-CA. Hasil amplifikasi DNA yang diinisiasi oleh pasangan primer tersebut menghasilkan produk PCR dengan

ukuran panjang sekitar 0,7 kb (Gambar 1). Dari hasil PCR tersebut, gen gag-ca tampak pada pita DNA yang tebal dan jelas dengan ukuran panjang sekitar 0,7 kb, meskipun DNA template tampak sebagai band DNA yang tipis dalam gel agarose 1,5 – 2 %.

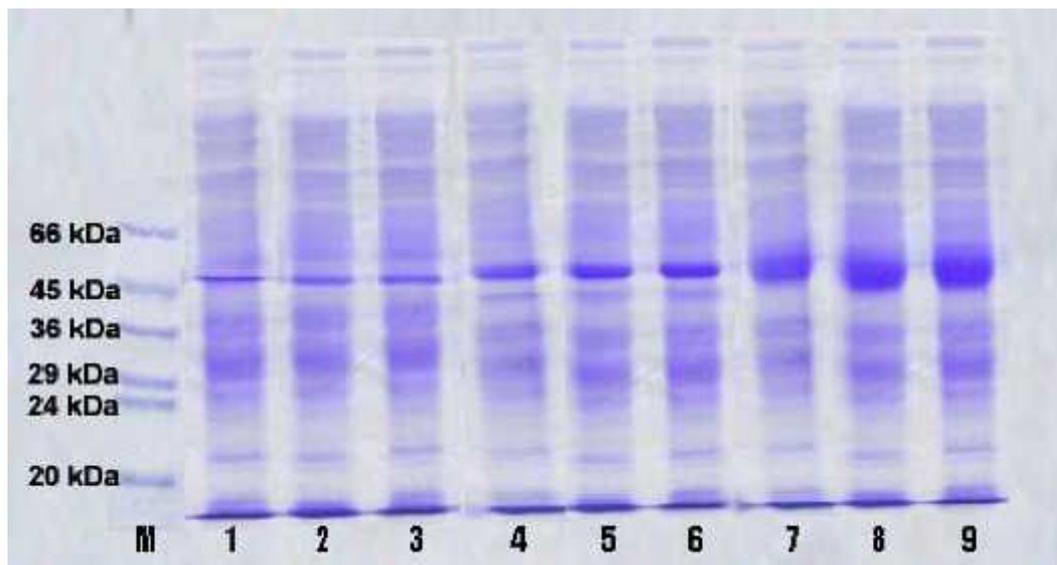
### B. Isolasi Protein Rekombinan

Protein rekombinan CA diharapkan dapat diekspresikan oleh bakteri transforman, dengan menggunakan plasmid PGEX-2T sebagai vektor ekspresi. Protein rekombinan diekspresikan sebagai protein fusi dengan GST (26 kDa). Protein rekombinan yang disintesis dalam E.coli BL 21 ini mempunyai berat molekul sebesar 48 kDa (22 kDa protein CA + 26 kDa GST). Gen GST mengandung sebuah ATG dan ribosome-binding site, dan di bawah kontrol promotor tac. Promotor tac merupakan promotor gen yang sangat kuat, sehingga protein rekombinan diharapkan dapat diekspresikan dalam

jumlah banyak. Promotor tac akan mengekspresikan protein rekombinan dengan adanya induksi IPTG.

Protein rekombinan diekspresikan dengan menumbuhkan bakteri transforman yang mengandung plasmid rekombinan (pGEX-CA) ke dalam medium 2X YTA. Medium 2X YTA merupakan medium diperkaya yang mengandung tripton dan ekstrak yeast, sehingga pertumbuhan bakteri transforman diharapkan lebih maksimal untuk dapat mengekspresikan protein rekombinan.

Isolasi protein fusi rekombinan CA ini mengacu pada penelitian pendahuluan (Kusumawati et al., 2003a), di mana digunakan kondisi kultur dan induksi IPTG paling optimal, yaitu pada medium 2X YTA dengan penambahan konsentrasi akhir 1 mM IPTG pada saat OD 600nm kultur mencapai 0,6 pada suhu inkubasi 37°C dengan penggojogan keras. Adapun hasil isolasi protein fusi CA dapat dilihat pada **Gambar 2**.



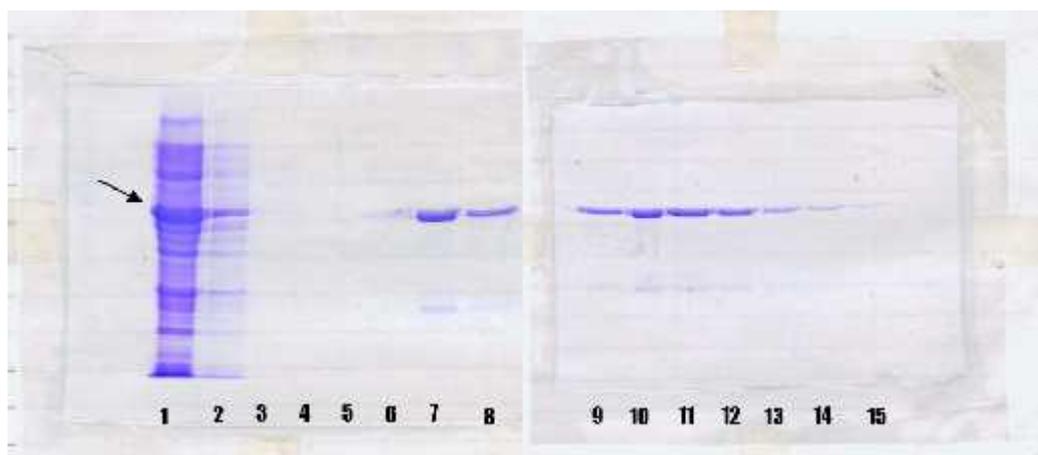
**Gambar 2.** Elektroforesis SDS-PAGE 10% crude extract hasil isolasi protein bakteri rekombinan. (M): Sigma Marker Low Range; (1-3): E.coli BL 21 (kontrol); (4- 6): pGEX-CA tanpa induksi IPTG; (7-9): pGEX-CA dengan diinduksi IPTG.

Dari Gambar 2 dapat dijelaskan bahwa sampel E.coli BL21 pGEX-CA yang dipisahkan dengan elektroforesis dari lajur 7-9 memperlihatkan adanya ekspresi yang lebih tinggi pada pita proteinnya bila dibandingkan dengan pita dari lajur 1 - 3 dan lajur 4 - 6. Hal ini disebabkan karena lajur 7-9 merupakan pGEX-CA yang diinduksi dengan IPTG sehingga ekspresinya optimal, sementara lajur 4-6 menunjukkan ekspresi yang lebih rendah dibandingkan lajur 7-9 karena tidak adanya induksi IPTG. Sementara itu, lajur 1-3 menunjukkan ekspresi yang paling rendah karena hanya berisi E.coli BL21 tanpa plasmid (kontrol). Hasil ini menunjukkan bahwa protein CA dari virus Jembrana yang berfusi dengan GST dapat diekspresikan dari pGEX-CA dan diproduksi oleh E.coli BL21.

### C. Purifikasi Protein

Pada tahap selanjutnya, sampel E. coli BL21 pGEX-CA yang

diperkirakan positif mengandung protein fusi CA dilakukan purifikasi protein fusi dengan menggunakan kolom kromatografi afinitas MicroSpin GST Purification (Pharmacia Biotech). Purifikasi dilakukan untuk memperoleh protein rekombinan yang akan digunakan sebagai calon vaksin virus penyakit Jembrana. Purifikasi protein ini dilakukan dengan cara sebagai berikut : sampel hasil ekspresi konstruksi pGEX-CA sebanyak 600 µl supernatan ekstrak bakteri dimasukkan dalam kolom MicroSpin GST, kemudian dilakukan pencucian dengan PBS 1x sebanyak 2 kali dan selanjutnya di-elusi dengan menggunakan reduced glutathione sebanyak 3 kali. Protein dari berbagai tahap purifikasi kemudian dianalisis dengan elektroforesis SDS-PAGE untuk melihat profil pita proteinnya. Hasil elektroforesis SDS-PAGE dari berbagai tahap proses purifikasi protein fusi CA dapat dilihat pada **Gambar 3**.



**Gambar 3.** Hasil elektroforesis SDS-PAGE 15% hasil purifikasi protein rekombinan bakteri E.coli BL 21 pGEX-CA dengan MicroSpin GST. (1): crude extract; (2): flow throw; (3): PBS 1; (4): PBS 2; (5): PBS 3; (6-15): Hasil elusi 1 - 10.

Setelah dilakukan purifikasi protein fusi CA dengan MicroSpin GST, maka nampak muncul pita dengan berat molekul yang sama dengan pita protein dari crude extract yang ekspresinya tinggi (diberi tanda panah dalam Gambar 3). Pada hasil elusi ke-1 (lajur 6) muncul pita protein yang mempunyai berat molekul sama dengan pita protein yang diberi tanda panah, sehingga diperkirakan terdapat protein fusi CA dengan GST.

Gambar 3 menunjukkan adanya protein dalam crude extract (kolom 1) dan dalam flow throw (kolom 2). Protein tersebut tidak didapatkan dalam fraksi pencucian (kolom 3, 4, dan 5). Protein muncul kembali dalam fraksi elusi (kolom 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 dan 15), meskipun hanya fraksi kecil dibanding protein utama yang dielusikan. Protein tersebut juga didapatkan pada crude extract (kolom 1) dan fraksi flow throw (kolom 2). Protein tersebut mungkin jenis protein yang menempel pada Glutathione Sepharose atau protein CA yang mengalami degradasi, tetapi masih berfusi dengan GST, yaitu sebagian dari daerah N-terminal.

Hasil di atas menunjukkan bahwa kolom afinitas Glutathione Sepharose cukup efisien, baik dalam penyingkiran protein yang tidak berinteraksi maupun dalam kapasitasnya untuk purifikasi protein rekombinan yang berfusi dengan GST.

Dari proses purifikasi ini dapat disimpulkan bahwa protein CA dapat diekspresikan dengan efisien dari konstruksi pGEX-CA sebagai protein yang berfusi dengan GST, dan purifikasinya dapat dilaksanakan dengan

baik menggunakan kolom Glutathione Sepharose 4B (MicroSpin GST).

#### **D. Pengukuran Konsentrasi Protein Fusi**

Pengukuran konsentrasi protein fusi CA dilakukan dengan Biuret Protein Assay, selanjutnya hasil pengukuran OD595nm dihitung dengan menggunakan kurva standard protein untuk menentukan konsentrasi protein dengan persamaan fungsi sebagai berikut:  $y = 0,0465x - 0,0157$  (di mana  $x$  merupakan konsentrasi protein; dan  $y$  merupakan absorbansi).

Dari hasil pengukuran OD595nm didapatkan bahwa absorbansi sampel hasil purifikasi dengan MicroSpin GST adalah 0,056. Dengan demikian, konsentrasi protein fusi CA setelah proses purifikasi adalah sebesar 1,542  $\mu\text{g/ml}$ .

#### **E. Pemotongan Protein Fusi CA dengan Thrombin Protease**

Pada tahap selanjutnya, protein CA yang berfusi dengan GST kemudian dilakukan pemotongan dengan Thrombin Protease. Thrombin Protease merupakan enzim yang bekerja sebagai katalis dalam reaksi pemecahan molekul protein dengan cara hidrolisis, yaitu memecah ikatan pada rantai peptida. Berat molekul bovine Thrombin Protease ialah sekitar 37 kDa (Amersham Biosciences, 2002). Tujuan pemotongan protein fusi CA dengan Thrombin Protease adalah untuk memperoleh protein CA murni yang akan digunakan untuk imunisasi. Sisi pemotongan yang optimum untuk Thrombin Protease terdapat 2 struktur (Amersham Biosciences, 2002), yaitu:

1. P4-P3-Pro-Arg/Lys•P1`-P2` dimana P3 dan P4 merupakan asam amino hidrofobik sedangkan P1` dan P2` merupakan asam amino nonacidic. Ikatan Arg/Lys•P1` terpotong. Contoh:

	P4	P3	Pro	R/K	•	P1`	P2`
A)	Met	Tyr	Pro	Arg	•	Gly	Asn
B)	Ile	Arg	Pro	Lys	•	Leu	Lys
C)	Leu	Val	Pro	Arg	•	Gly	Ser

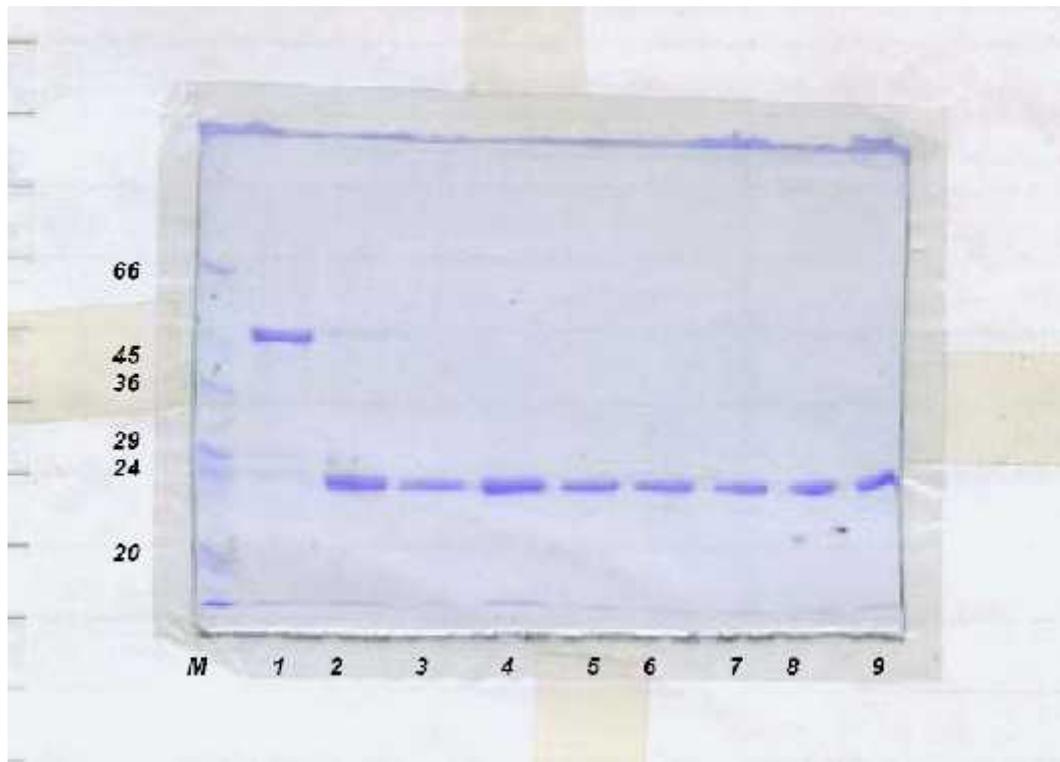
Pada skema A, ikatan antara Arg•Gly terpotong sangat cepat oleh Thrombin Protease. Pada skema B, ikatan Lys•Leu terpotong. C merupakan sekuen pengenalan yang ditemukan pada seri Thrombin Protease dari plasmid pGEX dan ikatan antara Arg•Gly terpotong.

2. P2-Arg/Lys•P1`, dimana P2 atau P1` adalah Gly. Ikatan Arg/Lys•P1` terpotong. Contoh:

	P2	R/K	•	P1`
A)	Ala	Arg	•	Gly
B)	Gly	Lys	•	Ala

Pada skema A, ikatan antara Arg•Gly terpotong secara efisien. Pada skema B, ikatan antara Lys•Ala terpotong (Amersham Biosciences, 2002). Untuk pemotongan protein CA dengan thrombin, terlebih dahulu dilakukan optimasi waktu inkubasi. Berdasarkan protokol dari Amersham Pharmacia disebutkan bahwa waktu inkubasi untuk pemotongan protein fusi dengan Thrombin Protease ialah antara 2-16 jam. Oleh karena itu, untuk menentukan waktu inkubasi yang tepat dilakukan

optimasi. Untuk optimasi dilakukan inkubasi dengan waktu 2, 4, 6, 8, 10, 12, dan 14 jam. Setelah inkubasi selesai, profil band dari seluruh sampel dianalisis dengan SDS-PAGE 15%. Perlu dijelaskan disini bahwa 1 unit Thrombin Protease akan memotong > 90% dari 100 µg protein fusi GST dalam 1X PBS pada suhu 22oC selama 16 jam (Amersham Biosciences, 2000). Dari proses ini, diperoleh hasil elektroforesis SDS-PAGE sebagaimana dapat dilihat pada **Gambar 4**.



**Gambar 4.** Hasil elektroforesis SDS-PAGE 15% setelah pemotongan dengan Thrombin Protease. (M): Marker; (1): Protein CA fusi GST; dan (2-9): Protein CA yang sudah dipotong dengan Thrombin Protease.

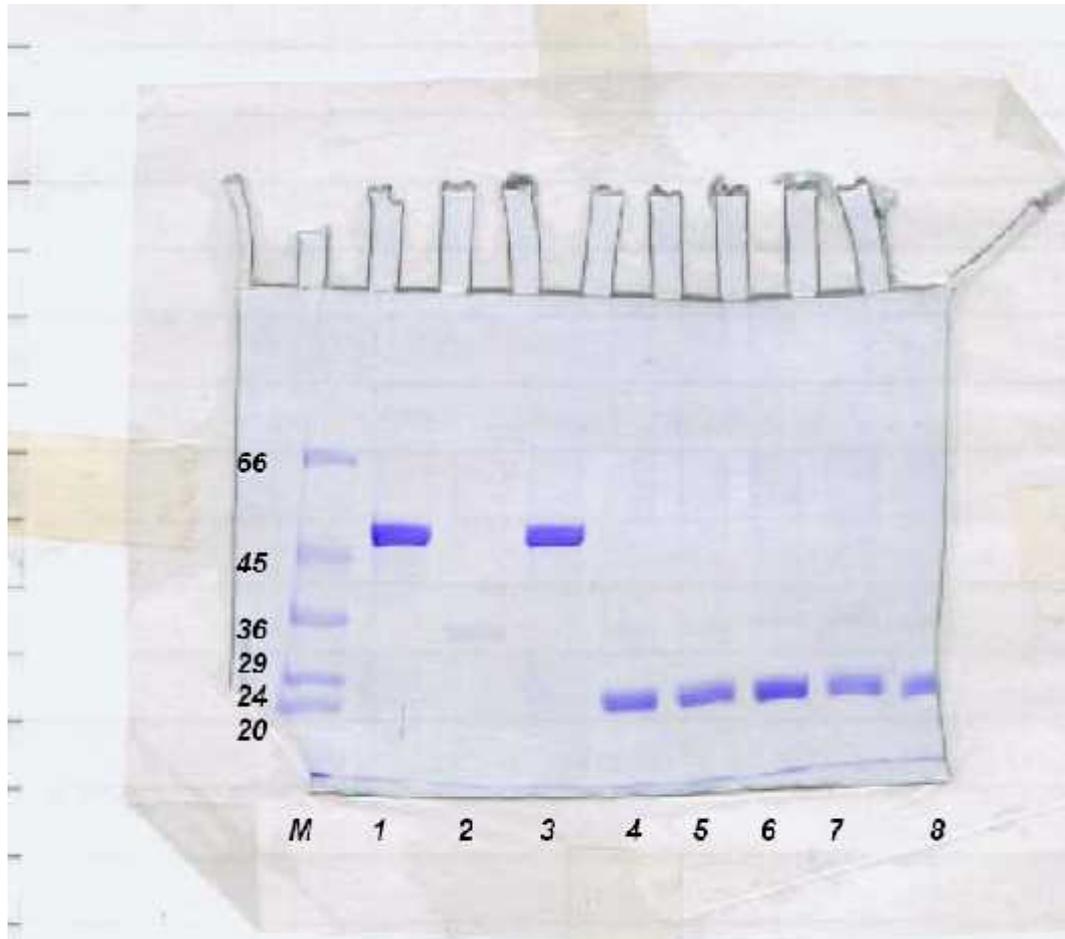
Dari Gambar 4 dapat dijelaskan bahwa lajur 1 merupakan protein CA yang masih berfusi dengan GST dengan estimasi berat molekul sekitar 48 kDa. Setelah melalui proses pemotongan dengan Thrombin Protease didapatkan protein CA murni dengan berat molekul sekitar 22 kDa.

Dari hasil SDS-PAGE tersebut juga dapat disimpulkan bahwa variasi waktu inkubasi untuk pemotongan dengan thrombin menghasilkan band yang diperkirakan mempunyai berat molekul yang sama. Hal ini dapat diasumsikan bahwa waktu inkubasi tidak berpengaruh terhadap hasil pemotongan. Bertolak dari hasil tersebut digunakan waktu inkubasi yang paling singkat, yaitu 2 jam, untuk

pemotongan CA dengan Thrombin Protease.

Selanjutnya, unit thrombin yang digunakan untuk pemotongan protein fusi CA dengan GST perlu dilakukan optimasi, dalam optimasi ini dipergunakan perlakuan unit thrombin 0, 2, 4, 6, 8, dan 10 unit. Hasil pemotongan dengan variasi unit thrombin ini selanjutnya dianalisis dengan SDS-PAGE 12,5%.

Berdasarkan hasil SDS-PAGE diketahui bahwa pemotongan CA dengan 6 unit thrombin memberikan hasil pemotongan yang optimal. Hasil optimasi unit thrombin untuk pemotongan protein fusi CA dapat dilihat pada **Gambar 5**.



**Gambar 5.** Elektroforesis SDS-PAGE 12,5% hasil pemotongan dengan variasi unit thrombin. (M): Marker; (1): hasil purifikasi dengan kolom MicroSpin; (2): thrombin protease; (3): 0 unit thrombin; (4): 2 unit thrombin; (5): 4 unit thrombin; (6): 6 unit thrombin; (7): 8 unit thrombin; (8): 10 unit thrombin.

Protein CA yang telah dipotong dengan thrombin selanjutnya diukur konsentrasi proteinnya dengan Biuret Assay. Dengan persamaan yang sama, jumlah protein yang diperoleh sebesar 0,234  $\mu\text{g}/\text{ml}$ .

## KESIMPULAN DAN SARAN

### Kesimpulan

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan, dapat disimpulkan bahwa Protein CA murni hasil ekspresi klon gen gag-ca dapat diisolasi melalui purifikasi

dengan kolom afinitas dan pemotongan dengan Thrombin Protease.

### Saran

Untuk pengembangan riset ini ke depan, ada beberapa saran yang bisa dikembangkan:

1. Untuk kelanjutan penelitian ini perlu dilakukan penelitian yang intensif untuk membangun konstruksi vaksin ini menjadi lebih optimal, baik dari segi kemurnian, dosis antigen yang optimal, pemilihan waktu

- penyuntikan booster, dan pemilihan hewan uji yang sesuai, yaitu sapi Bali.
2. Perlu dilakukan penelitian mengenai efektivitas calon vaksin protein CA terhadap infeksi penyakit Jembrana pada sapi Bali dan aspek keamanan dalam penggunaan calon vaksin protein CA pada sapi Bali.

## DAFTAR PUSTAKA

- Abbas A.K., Litchman A.H., and Pober J.S. 2000. Cellular and Molecular Immunology. W.B. Saunders Company, Philadelphia.
- Barnett, P.V., Pulle, L., Staple, R.F., Lee, L.J., Butcher, R., Parkinson, D. 1996. A Protective anti-Peptide Antibody Against the Immunodominant Site of the A24 Cruzeiro Strain of Foot and Mouth Disease Virus and Its Reactivity with Other Subtype Viruses Containing the Same Minimum Binding Sequence. *J. Gen. Virol.* 77: 1011-1018.
- Bittle, J.L., Houghten, R.A., Alexander, H., Schinnick, T.M., Sutcliff, J.G., Lerner, R.A. 1982. Protection against Foot and Mouth Disease by Immunization with a Chemically Synthesized Peptide predicted from the Viral Nucleotide Sequence. *Nature* 78: 298.
- Boulard, C.H., Lecrosey, A. 1982. Specific Antisera Produced by Direct Immunization with Slices of Polyacrylamide Gel Containing Small Amounts Protein. *J. Immunol. Methode* 50: 176-182.
- Broekhuijsen, M.P., Van Rijn, J.M.M., Blom A.J.M, Pouwels, P.H., Enger-Valk, B.E., Brown, F. 1987. Fusion Protein with Multiple Copies of the Major Antigenic Determinant of Foot and Mouth Disease Virus Protect both the Natural Host and Laboratory Animals. *J. Gen.* 68: 3137-3143.
- Brown, L., Edeman, E., Siemer, L., dan Langer, R. 1986. Controlled-Release System for Macromolecular: Methods and Application Advances in Carriers and Adjuvants for Veterinary Biologies. Iowa State University Press.
- Brownlie, J., 1998. The Development of Recombinant ELISA for Jembrana Disease Virus. Worksheet. Royal Veterinary College. University of London.
- Burgess, G.W. 1988. ELISA Technology in Diagnosis and Research. James Cook University of North Queensland.

- Burkala E.J., Narayani I., Hartaningsih N., Kertayadnya G., Berryman D.I., and Wilcox G.E. 1998. Recombinant Jembrana Disease Virus Proteins as Antigens for Detection of Antibody to Bovine Lentiviruses. *J. Virol. Methods.* 74: 39-46
- Burkala E.J., Ellis, T.M., Voight V. and Wilcox G.E. 1999. Serological Evidence of an Australian Bovine Lentivirus. *Vet. Microbiol.* 68: 171-177 55
- Chadwick, B.J., Coelen, R.J., Sammels, L.M., Kertayadnya, G. and Wilcox, G.E. 1995a. Genomic Sequence Analysis of Jembrana Disease Virus as a New Bovine Lentivirus. *J. Gen. Virol.* 76: 189-192
- Chadwick B.J., Coelen R.J., Wilcox G.E., Sammels L.M., and Kertayadnya. 1995. Nucleotide Sequence Analysis of Jembrana Disease Virus: a Bovine Lentivirus Associated with Acute Disease Syndrome. *J. Gen. Virol.* 76: 1637-1650
- Chadwick B.J., Desport M., Brownlie J., Wilcox G.E., Dharma, D.M. 1998. Detection Of Jembrana Disease Virus In Spleen, Lymph Nodes, Bone Marrow and Other Tissues by In Situ Hybridization of Paraffin- Embedded Sections. *J. Gen. Virol.* 79: 101-106
- Dalsgaard, K. 1985. The Savonin Adjuvants Quil A. *Vaccine* 3: 155
- Delmas, A., dan Partidos, C.D. 1996. The Binding of Chimeric Peptides to GM1 gangliosides Enables Induction of Antibody Responses after Intranasal Immunization. *Vaccine* 14: 1077-1082
- Deutscher, M.P. 1990. Guide to Protein Purification. Volume 182. Academic Press, Inc. San Diego.
- Dharma, D.M.N., Budiantono A, Campbell R.S.F., Ladds, P.W. 1991. Studies on experimental Jembrana disease in Bali cattle. III. Pathology. *J. Comp. Path.* 105: 397-414
- DiMarchi, R., Brooke, G., Gale, C., Crocknell, V., Doel, T., dan Mowad, N. 1986. Protection of Cattle against Foot and Mouth Disease by Immunization by a Synthetic Peptide. *Science* 232: 639-641.
- Erlich, H.A. 1989. PCR Technology. Stocton Press New York: 1-5.
- Fenner, F.J., Gibbs, P.E., Murphy, F.A., Rott, R. Studdert, M.J. White, D.O. 1990. *Veterinary Virology.* Academic Press Inc.
- Goding, JW. 1986. *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice.* Edisi ke-2. Academic Press. London
- Harper, D.R. 1993. *Virology Lab Fax.* Bio Scientific Publisher Limited. New York

- Ijaz, M.K., Attah Poku, S.K., Redmond, M.J., Parker, M.I., Babiuk, L.A. 1991. Heterotypic Passive Protection Induced by Synthetic Peptides Corresponding to VP7 and VP4 of Bovine Rotavirus. *J. Virol.* 65: 3106- 3113.
- Innis, M.A., Gelfand, DH. 1990. Optimization of PCR. Dalam Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky, J.J., White. PCR Protocol. Academic Press. Inc SanDiego: 3-12
- Jeneway, C.A., Travers, P., Walport, M., Shlomchick, M. 2001. Immunobiology. Edisi ke-5. Garland Publishing. New York.
- Jones, D.H., Partidos, C.D., Steward, M.W., Farrar, G.H. 1997. Oral Delivery of Poly (Lactide-co-glycolide) Encapsulated Vaccines. *Behring Inst. Mitt.* 98: 220-228.
- Kakoma, I., Ristic M., Essex. 1988. Animal Retroviruses. *Vet. Microbiol.* 17 (Special Issue), halaman 195.
- Kusumawati A., Widada, J.S., Sardjono, B., Mangkoewidjojo, S. 2003b. Pembuatan vaksin protein rekombinan dan vaksin DNA penyakit Jembrana. Laporan Penelitian Hibah Bersaing X/2 Perguruan Tinggi. Lembaga Penelitian Universitas Gadjah Mada.
- Kusumawati A., Martien R., Mangkoewidjojo, S., Widada, J.S. 2003a. Isolation and cloning of gag-ca subunit gene of Jembrana disease virus in the prokaryotic expression vector pGEX-2T. *Biologi*, I: 2003.
- Kusumawati A., Pranowo, D., Widada, J.S. 2002b. Construction of an eukaryotic pcDNA3.1(+)-based vector for the expression of Jembrana disease virus gag-ca subunit gene. *I.J. Biotech.* Dec: 578-583.
- Kusumawati A., Pranowo, D., Mangkoewidjojo, S. Widada, J.S. 2002a. Isolation of gag-ca subunit of Jembrana virus from the viral genome by RT-PCR and its cloning in pCR2.1-topoplasmid using topoisomerase-based system. *I.J. Biotech.* June: 544-549.
- Langeveld, J.P., Casal, J.I., Osterhaus, A.D.M.E., Cotes, E., Swart, R., Vela, C. 1994. First peptide vaccine providing protection against viral infection in target animal: studies of canine parvovirus in dogs. *J.Virol.* 68(7), 4506-4513.
- Liew, F.Y., 1985. New Aspects in Vaccine Development. *Clin. Exp. Immunol.* 62: 189-197.
- Loangeveld, J.P.M., Kamstrup, S., Utthental, A., Strandbygaard, B., Vela, C., 1994. Full Protection in Mink Against Mink Enteritis Virus with New Generation Canine Parvovirus Vaccines Based on Synthetic Peptide or Recombinant Protein. *Vaccine* 13: 1033-1037.

- Ogra, P.L., Faden, H., Welliver, R.C. 2001. Vaccination Strategies of Mucosal Immune Responses. *Clin. Microbial Rev.* 14: 430-445
- Partidos, C.D., Beignon, A.S., Semetey, V., Briand, J.P., dan Muller, S. 2001. The Bare Skin and the Nose as non-Invasive Routes for Administration of Peptide Vaccine. *Vaccine* 19: 2708-2715.
- Partidos, C.D., Vohra, P., Steward, M.W. 1996. Induction of Measles Virus-Specific Cytotoxic T-Cell Response after Intranasal Immunization with Synthetic Peptides. *Immunology* 87: 179-185.
- Robinson, A., Hudson, M.J., dan Cranage, M.P. 2003. *Vaccine Protocols*. Edisi ke-2. Humana Press. New Jersey.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Edisi ke-2. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Scopes, R.K., 1994. *Protein Purification: Principles and Practice*. Edisi ke-2. Springer-Verlag New York.
- Soeharsono S, Wilcox G.E, Dharma D.M.N. 1995. Species differences in the reaction of cattle to Jembrana disease virus. *J. Comp. Path.* 112:391-402
- Soeharsono S. 1997. Current Information on Jembrana Disease Distribution in Indonesia. Dalam : *Jembrana Disease and the Bovine Lentiviruses*. ACIAR Proceedings. ACIAR, Canberra 75: 72-75
- Soesanto M., Soeharsono S., Budiantono, A. Studies on experimental Jembrana disease in Bali cattle. II. Clinical signs and haematological changes. *J. Comp. Path.* 103: 61-71
- Taboga, O., Tami, C., Carrillo, E., Nunes, J.I., Rodriguez, A., Saiz, J.C., Blanco, E., Valero, M., Roig, X., Camarero, J.A., Andreu, D., Mateu, M.G., Giralt, E., Domingo, E., Sabrino, F., dan Palma, E.L. 1997. A Large-Scale Evaluation of Peptide Vaccines against Foot-and-Mouth Disease: Lack of Solid Protection in Cattle and Isolation of Escape Mutants. *J. Virol.* 71: 2606-2614.
- Vanslow, B.A. 1987. The Application of Adjuvants to Veterinary Medicine. *Vet. Bull.* 57: 881-896
- Yuwono, Triwibowo. 1992. *Petunjuk Laboratorium Reaksi Rantai Polimerase*. PAU Bioteknologi UGM. Yogyakarta.

Zheng, L., Zhang, S., Wood, C., Kapil, S., Wilcox, G.E., Loughin, T.A., Minocha, H.C.  
2001. Differentiation of Two Bovine Lentivirus by a Monoclonal Antibody on the Basis  
of Epitope Specificity. *Clin. Diagnos. Lab. Immun.* 233: 283-287