



ISSN 0126-1754

Volume 10, Nomor 2, Agustus 2010

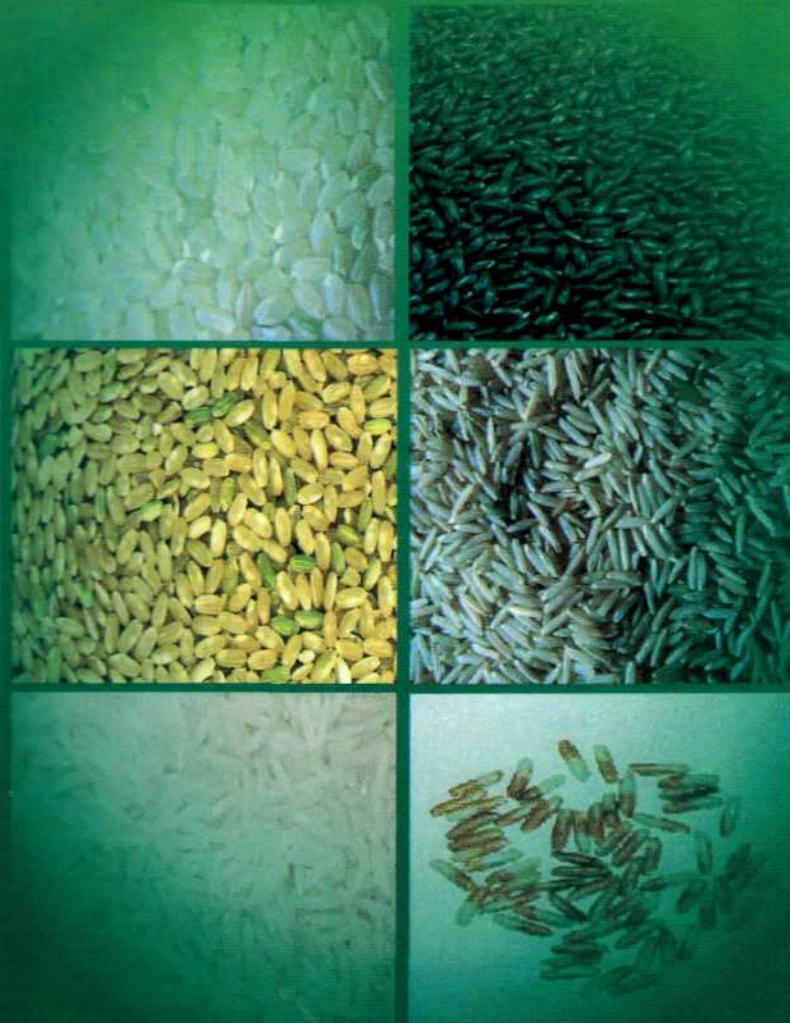
Terakreditasi Peringkat A

SK Kepala LIPI

Nomor 180/AU1/P2MBI/08/2009

# Berita Biologi

Jurnal Ilmu-ilmu Hayati



Diterbitkan oleh  
Pusat Penelitian Biologi - LIPI

**Berita Biologi** merupakan Jurnal Ilmiah ilmu-ilmu hayati yang dikelola oleh Pusat Penelitian Biologi - Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia (LIPI), untuk menerbitkan hasil karya-penelitian (original research) dan karya-pengembangan, tinjauan kembali (review) dan ulasan topik khusus dalam bidang biologi. Disediakan pula ruang untuk menguraikan seluk-beluk peralatan laboratorium yang spesifik dan dipakai secara umum, standard dan secara internasional. Juga uraian tentang metode-metode berstandar baku dalam bidang biologi, baik laboratorium, lapangan maupun pengolahan koleksi biodiversitas. Kesempatan menulis terbuka untuk umum meliputi para peneliti lembaga riset, pengajar perguruan tinggi maupun pekerjanya-tesis sarjana semua strata. Makalah harus dipersiapkan dengan bepedoman pada ketentuan-ketentuan penulisan yang tercantum dalam setiap nomor.

Diterbitkan 3 kali dalam setahun yakni bulan April, Agustus dan Desember. Setiap volume terdiri dari 6 nomor.

### **Surat Keputusan Ketua LIPI**

Nomor: 1326/E/2000, Tanggal 9 Juni 2000

### **Dewan Pengurus**

#### **Pemimpin Redaksi**

B Paul Naiola

#### **Anggota Redaksi**

Andria Agusta, Dwi Astuti, Hari Sutrisno, Iwan Saskiawan

Kusumadewi Sri Yulita, Tukirin Partomihardjo

#### **Redaksi Pelaksana**

Marlina Ardiyani

#### **Desain dan Komputerisasi**

Muhamad Ruslan, Yosman

#### **Sekretaris Redaksi/Korespondensi Umum**

(berlangganan, surat-menyurat dan kearsipan)

Enok, Ruswenti, Budiarto

Pusat Penelitian Biologi-LIPI  
Kompleks Cibinong Science Center (CSC-LIPI)  
Jin Raya Jakarta-Bogor Km 46,  
Cibinong 16911, Bogor - Indonesia  
Telepon (021) 8765066 - 8765067  
Faksimili (021) 8765059  
e-mail: [berita.biologi@mail.lipi.go.id](mailto:berita.biologi@mail.lipi.go.id)  
[ksamajp2biologi@yahoo.com](mailto:ksamajp2biologi@yahoo.com)  
[herbogor@indo.net.id](mailto:herbogor@indo.net.id)

*Keterangan foto cover depart: Keragaman genetik plasma nutfahpadi beras putih dan beras warna, sesuai makalah di halaman 143 Foto: Dwinita W Utami - Koleksi BB Biogen-Badan Pengembangan dan Penelitian Pertanian-Departemen Pertanian.*

## Anggota Referee / Mitra Bestari

### **Mikrobiologi**

Dr Bambang Sunarko (*Pusat Penelitian Biologi-LIPI*)  
Prof Dr Feliatra (*Universitas Riau*)  
Dr Heddy Julistiono (*Pusat Penelitian Biologi-LIPI*)  
Dr I Nengah Sujaya (*Universitas Uday and*)  
Dr Joko Sulistyono (*Pusat Penelitian Biologi-LIPI*)  
Dr Joko Widodo (*Universitas Gajah Mada*)  
Dr Lisdar I Sudirman (*Institut Pertanian Bogor*)  
Dr Ocky Kama Radjasa (*Universitas Diponegoro*)

### **Mikologi**

Dr Dono Wahyuno (*BB Litbang Tanaman Rempah dan Obat-Deptan*)  
Dr Kartini Kramadibrata (*Pusat Penelitian Biologi-LIPI*)

### **Genetika**

Prof Dr Alex Hartana (*Institut Pertanian Bogor*)  
Dr Warid Ali Qosim (*Universitas Padjadjaran*)  
Dr Yuyu Suryasari Poerba (*Pusat Penelitian Biologi-LIPI*)

### **Taksonomi**

Dr Ary P Keim (*Pusat Penelitian Biologi-LIPI*)  
Dr Daisy Wowor (*Pusat Penelitian Biologi-LIPI*)  
Prof (Ris) Dr Johanis P Moge (Pusat Penelitian Biologi-LIPI)  
Dr Rosichon Ubaidillah (*Pusat Penelitian Biologi-LIPI*)

### **Biologi Molekuler**

Dr Eni Sudarmonowati (*Pusat Penelitian Bioteknologi-LIPI*)  
Dr Endang Gati Lestari (*BB Litbang Bioteknologi dan Sumberdaya Genetik Pertanian-Deptan*)  
Dr Hendig Winarno (*Badan Tenaga Atom Nasional*)  
Dr I Made Sudiana (*Pusat Penelitian Biologi-LIPI*)  
Dr Nurlina Bermawie (*BB Litbang Tanaman Rempah dan Obat-Deptan*)  
Dr Yusnita Said (*Universitas Lampung*)

### **Bioteknologi**

Dr Nyoman Mantik Astawa (*Universitas Udayana*)  
Dr Endang T Margawati (*Pusat Penelitian Bioteknologi-LIPI*)  
Dr Satya Nugroho (*Pusat Penelitian Bioteknologi-LIPI*)

### **Veteriner**

Prof Dr Fadjar Satrija (*FKH-IPB*)

### **Biologi Peternakan**

Prof (Ris) Dr Subandryono (*Pusat Penelitian Ternak-Deptan*)

### **Ekologi**

Dr Didik Widyatmoko (*Pusat Konservasi Tumbuhan-LIPI*)  
Dr Dewi Malia Prawiradilaga (*Pusat Penelitian Biologi-LIPI*)  
Dr Frans Wospakrik (*Universitas Papua*)  
Dr Herman Daryono (*Pusat Penelitian Hutan-Dephut*)  
Dr Istomo (*Institut Pertanian Bogor*)  
Dr Michael L Riwu Kaho (*Universitas Nusa Cendana*)  
Dr Sih Kahono (*Pusat Penelitian Biologi-LIPI*)

### **Biokimia**

Prof Dr Adek Zamrud Adrian (*Universitas Andalas*)  
Dr Deasy Natalia (*Institut Teknologi Bandung*)  
Dr Elfahmi (*Institut Teknologi Bandung*)  
Dr Herto Dwi Ariesyadi (*Institut Teknologi Bandung*)  
Dr Tri Murningsih (*Pusat Penelitian Biologi -LIPI*)

### **Fisiologi**

Prof Dr Bambang Sapto Purwoko (*Institut Pertanian Bogor*)  
Dr Gono Semiadi (*Pusat Penelitian Biologi-LIPI*)  
Dr Irawati (*Pusat Konservasi Tumbuhan-LIPI*)  
Dr Nuril Hidayati (*Pusat Penelitian Biologi-LIPI*)  
Dr Wartika Rosa Farida (*Pusat Penelitian Biologi-LIPI*)

### **Biostatistik**

Ir Fahren Bukhari, MSc (*Institut Pertanian Bogor*)

### **Biologi Perairan Darat/Limnologi**

Dr Cynthia Henny (*Pusat Penelitian Limnologi-LIPI*)  
Dr Fauzan Ali (*Pusat Penelitian Limnologi-LIPI*)  
Dr Rudhy Gustiano (*Balai Riset Perikanan Budidaya Air Tawar-DKP*)

### **Biologi Tanah**

Dr Rasti Saraswati (*BB Sumberdaya Lahan Pertanian-Deptan*)

### **Biodiversitas dan Ikiim**

Dr Rizaldi Boer (*Institut Pertanian Bogor*)  
Dr Tania June (*Institut Pertanian Bogor*)

### **Biologi Kelautan**

Prof Dr Chair Rani (*Universitas Hasanuddin*)  
Dr Magdalena Litaay (*Universitas Hasanuddin*)  
Prof (Ris) Dr Ngurah Nyoman Wiadnyana (*Pusat Riset Perikanan Tangkap-DKP*)  
Dr Nyoto Santoso (*Lembaga Pengkajian dan Pengembangan Mangrove*)

Berita Biologi menyampaikan terima kasih  
kepada para Mitra Bestari/ Penilai (Referee) nomor ini  
10(2)-Agustus 2010

Dr. Andria Agusta - *Pusat Penelitian Biologi LIPI*  
Dr. Ary P. Keim - *Pusat Penelitian Biologi LIPI*  
Dr. B Paul Naiola - *Pusat Penelitian Biologi LIPI*  
Dr. Endang Gati Lestari - *BB Litbang Bioteknologi dan  
Sumberdaya Genetik Pertanian-Deptan*  
Dr. Endang Tri Margawati - *Pusat Penelitian Bioteknologi LIPI*  
Dr. Iwan Saskiawan - *Pusat Penelitian Biologi LIPI*  
Dr. Kusumadewi Sri Yulita - *Pusat Penelitian Biologi LIPI*  
Dr. Marlina Ardiyani - *Pusat Penelitian Biologi LIPI*  
Dr. Satya Nugroho - *Pusat Penelitian Bioteknologi LIPI*

#### Referee/ Mitra Bestari Undangan

Drs. Edi Mirmanto, M.Sc. - *Pusat Penelitian Biologi LIPI*  
Dr. Herwasono Soedjito - *Pusat Penelitian Biologi LIPI*  
Dr. Joeni Setijo Rahajoe - *Pusat Penelitian Biologi LIPI*  
Dr. Rianta - *Pusat Penelitian Limnologi LIPI*  
Dr. Syahroma H. Nasution - *Pusat Penelitian Limnologi*  
Prof. (Ris.) Dr. Woro A. Noerdjito - *Pusat Penelitian Biologi LIPI*  
Dra. Yuliasri Jamal, M.Sc. - *Pusat Penelitian Biologi LIPI*

## DAFTAR ISI

**MAKALAH HASIL RISET (ORIGINAL PAPERS)**

<b>PENINGKATAN KUALITAS NUTRISI TEPUNG DAUN LAMTORO SEBAGAI PAKAN IKAN DENGAN PENAMBAHAN EKSTRAK ENZIM CAIRAN RUMEN DOMBA</b> (Improvement Nutrition Value of <i>Leucaena</i> Leaf Meal as Fish Feed with Addition of Sheep Rumens Fluid Enzyme)	
<i>Indira Fitriyani, Enang Harris, Ing Mokoginta, Nahrowi</i> .....	135
<b>SIDIJARI DNA PLASMA NUTFAH PADI LOKAL MENGGUNAKAN MARKA MOLEKULER SPESIFIK UNTUK SIFAT PADI BERAS MERAH</b> [DNA Fingerprinting of Local Rice Germplasm using The Specific Markers for Red Rice]	
<i>Dwinita W. Utami, Aderahma Ilhami, Ida Hanarida</i> .....	143
<b>PENGUNAAN VAKSIN <i>Aeromonas hydrophila</i>: PENGARUHNYA TERHADAP SINTASAN DAN IMUNITAS LARVA IKAN PATIN (<i>Pangasionodon hypophthalmus</i>)</b> (The Application of <i>Aeromonas hydrophila</i> Vaccine: The Effects on The Survival Rate and Immunity of Patin Seed ( <i>Pangasionodon hypophthalmus</i> )]	
<i>Angela M Lusiasuti dan Wartono Hadie</i> .....	151
<b>KEANEKARAGAMAN LUMUT DI TAMAN NASIONAL BUKIT BARISAN SELATAN, PROVINSI LAMPUNG, SUMATERA</b> [Mosses Diversity In Bukit Barisan Selatan National Park, Lampung Province, Sumatera]	
<i>Florentina Indah Windadri</i> .....	159
<b>PRIMER-PRIMER BARU UNTUK MENGAMPLIFIKASI GEN PENGKODE PROTEIN AMPLOP VIRUS DENGUE STRAIN CH53489</b> [Novel Primers to Amplify The Gene Coding for Envelope Protein of Dengue Virus Strain CH53489]	
<i>Ira Djajanegara</i> .....	167
<b>ANALISIS VEGETASI POHON DI HUTAN HUJAN TROPIS HARAPAN, JAMBI</b> [Vegetation Analysis of Trees in Harapan Rainforest, Jambi]	
<i>Muhammad Mansur, Teguh Triono, Ismail, Setyawan Warsono Adi, Enu Wahyu, Gofar Ismail</i> .....	173
<b>KEANEKARAGAMAN KUMBANG LUCANID (Coleoptera: <i>Lucanidae</i>) DI TAMAN NASIONAL BOGANI NANI WARTA BONE, SULAWESI UTARA</b> [Lucanids Beetle Diversity (Coleoptera: <i>Lucanidae</i> ) in the Bogani Nani Wartabone National Park, North Sulawesi]	
<i>Roni Koneri</i> .....	179
<b>ANALISIS PREDIKSI SEBARAN ALAMI GAHARU MARGA <i>Aquilaria</i> DAN <i>Gyrinops</i> DI INDONESIA</b> [Natural Distribution Prediction Analyses of Agarwood Genera of <i>Aquilaria</i> and <i>Gyrinops</i> in Indonesia]	
<i>Roemantyo dan Tukirin Partomihardjo</i> .....	189
<b>VIRULENCE OF <i>Xanthomonas oryzae</i> pv. <i>oryzae</i> AND REACTION OF RICE GENOTYPES TO THE RACES OF THE PATHOGEN</b> [Virulensi <i>Xanthomonas oryzae</i> pv. <i>oryzae</i> dan Reaksi Genotipe Padi Terhadap Ras Patogen]	
<i>Y Suryadi and Triny S Kadir</i> .....	199



<b>KEANEKARAGAMAN TUMBUHAN PULAU SEPANJANG JAWA TIMUR</b> [Plant Diversity of Sepanjang Island, East Java] <i>Rugayah, Suhardjono, S Susiarti</i> .....	205
PENGARUH LAMA PENYIMPANAN, SUHU DAN LAMA PENGERINGAN KENTANG TERHADAP KUALITAS KERIPIK KENTANG PUTIH [Effect of Storage, Temperature and Drying Duration of Potato on Potato chip Quality] <i>AH Asgar, Asih Kartasih, Asep Supriadi dan Henna Trisdyani</i> .....	217
<b>SELEKSIJAMUR TANAH PENGURAI LIGNIN DAN PAH DARI BEBERAPA LINGKUNGAN DI BALI</b> [The Selection of Lignin and PAHs Degrading Fungi from Some Environment in Bali] <i>YB Subowo dan Corazon</i> .....	227
PENGARUH EKSTRAK AIR DAN ETANOL <i>Kaempferia</i> spp. TERHADAP AKTIVITAS DAN KAPASITAS FAGOSITOSIS SEL MAKROFAG YANG DIINDUKSI BAKTERI <i>Staphylococcus epidermidis</i> [Influenced of Water and Ethanol Extracts of <i>Kaempferia</i> spp. to Phagocytosis Activity and Capacity Macrophage Cells Induce by <i>Staphylococcus epidermidis</i> ] <i>Tri Murningsih</i> .....	235
<b>KERAGAMAN BAKTERI ENDOFITIK PADA EMPAT JENIS VARIETAS PADI DENGAN METODA ARDRA (Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis)</b> [The Diversity of Endophytic Bacteria Within Four Different Rice Varieties by Using ARDRA (Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis) Method] <i>Dwi N Susilowati, Nurul Hidayatun, Tasliah, dan KMulya</i> .....	241
<b>RESPON TANAMAN PADI GOGO (<i>Oryza sativa</i> L.) TERHADAP STRESS AIR DAN INOKULASI MIKORISA</b> [Response of Upland Rice ( <i>Oryza sativa</i> L.) Under Water Stress and Mycorrhizae Inoculation] <i>Harmastini Sukiman, Syoflatin Syamsiyah dan Adiwirman</i> .....	249
<b>KOMPOSISI JENIS KEPITING (Decapoda: <i>Brachyura</i>) DALAM EKOSISTEM MANGROVE DAN ESTUARI, TAMAN NASIONAL BALI BARAT</b> [Crabs (Decapoda: <i>Brachyura</i> ) Species Composition in Mangrove and Estuarine Ecosystem, West Bali National Park] <i>Dewi Citra Murniati</i> .....	259
<b><u>KOMUNIKASI PENDEK</u></b>	
<b>CATATAN JENIS-JENIS TUMBUHAN ASING DAN INVASIF DI TAMAN NASIONAL GUNUNG CEDE PANGRANGO, JAWA BARAT</b> [Recorded of Alien Invasive Species in Gunung Gede Pangrango National Park, West Java] <i>Sunaryo dan Eka F Tihurua</i> .....	265

# PRIMER-PRIMER BARU UNTUK MENGAMPLIFIKASI GEN PENGKODE PROTEIN AMPLOP VIRUS DENGUE STRAIN CH53489<sup>1</sup> [Novel Primers to Amplify The Gene Coding for Envelope Protein of Dengue Virus Strain CH53489]

Ira Djajanegara

Pusat Teknologi Bioindustri - BPPT  
Gedung BPPT 2 Lantai 15, Jl. M.H. Thamrin 8, Jakarta-10340

## ABSTRACT

Restriction site of BamHI and Sail must be added in order to express the gene encoding envelope protein of dengue virus strain CH53489 (gene E) into expression vector pMAL-p2x. This approach required the PCR technique for amplification as well as restriction sites addition. However, PCR amplification is prone to error due to the process of misincorporation eventhough using Platinum taq polymerase. Therefore, it is important to be concern that there will be no alteration of the gene especially for biopharmaceutical purposes such as recombinant vaccine. This experiment was aimed to design several primers of DenV-M F, D3-1715s, D3-2117s, D3-1911c and DenV-M R for full length sequencing of the amplified products. Primers were designed in silico using Oligo Explorer and tried in vitro to check the ability of the primers to produce fragments. The sequencing results showed that the amplified product suffered from misincorporation during amplification (98.9% homology). However, the 3-D protein structure prediction did not show any major changes in the protein structure. Further analysis of the expressed protein is required to be used for biopharmaceutical purposes.

**Kata kunci:** Protein amplop, virus dengue strain CH53489, PCR, misinkorporasi, sekuens penuh

## PENDAHULUAN

Penyakit demam berdarah Dengue adalah salah satu penyakit tropis yang berbahaya di dunia terutama di negara tropis seperti Indonesia. Menurut Guirakhoo *et al.* (2004), paling tidak 40% dari populasi dunia terkena resiko terserang virus dengue. Terdapat 4 serotipe virus dengue yang umumnya dijumpai di Indonesia yaitu serotipe 1, 2, 3 dan 4 dimana yang paling sering dijumpai adalah serotipe 2 dan 3. Adapun salah satu jenis strain virus dengue serotipe 3 adalah CH53489 dimana strain ini telah dibuktikan positif untuk digunakan dalam bidang kesehatan baik untuk keperluan diagnostik maupun terapeutik.

Virus dengue serotipe 3 strain CH53489 dapat digunakan sebagai model untuk mendesain vaksin atau kit deteksi dalam rangka menanggulangi wabah penyakit demam berdarah dengue di Indonesia, karena strain ini adalah jenis yang paling banyak ditemui untuk serotipe 3. Alasan lain adalah meskipun serotipe 2 dan 3 umum dijumpai di Indonesia, namun serotipe 3 menimbulkan gejala lebih parah. Gejala yang timbul akibat infeksi virus dengue sangat bervariasi mulai dari gejala virus nonspesifik sampai kematian. Menurut Chaturvedi dan Shrivastava (2004), beberapa faktor yang mempengaruhi derajat keganasan dari demam berdarah dengue adalah jenis serotipe dan strain dari

virus tersebut, usia, status imun dan faktor genetis si pasien. Oleh karena itu, penting bagi penduduk yang tinggal di daerah endemik demam berdarah seperti Indonesia untuk divaksinasi dengan serotipe yang paling ganas seperti misalnya serotipe 3.

Di antara semua komponen dari tubuh virus, protein amplop memegang peranan penting dalam interaksi antara virus dan inangnya. Protein amplop terlibat dalam pengenalan dan penempelan di reseptor pada inangnya selain respons imun (Chang *et al.*, 1995). Dapat disimpulkan bahwa protein amplop merupakan aspek penting dalam vaksinasi. Studi secara lebih mendalam terhadap protein amplop dari virus dengue strain CH53489 di mana gen pengkode protein amplop ini dikenal dengan nama gen E. Ini akan sangat membantu pembuatan vaksin maupun kit diagnostik untuk menanggulangi wabah penyakit berbahaya ini. Gen E relatif terkonservasi dan terbukti tidak mengalami mutasi sehingga layak dipakai dalam pembuatan vaksin dan kit diagnostik.

Salah satu cara untuk memproduksi protein amplop suatu virus yang akan dipakai sebagai vaksin maupun alat diagnostik dalam jumlah yang tidak terbatas adalah dengan cara mengekspresikan gen pengkode protein tersebut pada organisme lain sehingga proses produksi dapat ditingkatkan jumlah

dan kecepatannya. Beberapa sistem ekspresi heterolog yang telah banyak dipakai antara lain adalah ekspresi di bakteri (*Escherichia coli*), khamir (*Pichia pastoris*) dan tembakau (*Nicotiana tabacum*) (Julian *et al.*, 2005). Dalam penelitian ini, gen pengkode protein amplop dari virus dengue strain CH53489 dicoba diekspresikan di *E. coli* dengan menggunakan vektor ekspresi pMAL-p2x. Akan tetapi, dalam upaya memasukkan gen tersebut ke dalam vektor ekspresi, dua situs restriksi perlu ditambahkan. Salah satu cara penambahan situs restriksi adalah dengan proses Polymerase Chain Reaction (PCR). Situs restriksi *BamHI* ditambahkan pada posisi 5' dari primer DenVM-F sedangkan situs restriksi *SalI* ditambahkan pada posisi 3' dari primer DenVM-R. Namun demikian, penambahan ini membutuhkan proses PCR yang dikenal kurang akurat dalam menginkorporasikan nukleotida sehingga dapat menimbulkan terjadinya mutasi.

Replikasi DNA bukanlah suatu proses yang sempurna dimana DNA polymerase sering melakukan beberapa kesalahan atau mutasi seperti penambahan, pengurangan atau salah menginkorporasikan nukleotida-nukleotida. Laju kesalahan selama proses replikasi adalah 1 per  $10^9$  nukleotida. Kesalahan ini dapat dihindari jika proses replikasi dilakukan secara *in vivo* karena DNA polymerase yang ada di dalam sel mempunyai kemampuan untuk memeriksa dan mengganti nukleotida-nukleotida yang menyimpang. Masalahnya Taq Polymerase yang dipakai untuk mereplikasi DNA secara *in vitro* dalam proses PCR tidak memiliki kemampuan tersebut. Walaupun menggunakan beberapa Taq Polymerase khusus yang mempunyai keakuratan tinggi seperti Platinum Taq Polymerase, masih terjadi kemungkinan kesalahan inkorporasi yaitu sebesar 11% - 57% (Invitrogen, 2005). Mengingat adanya resiko terjadinya mutasi dalam proses perbanyakan DNA, terutama yang akan dipakai sebagai bahan pengobatan baik secara terapeutik maupun diagnostik, maka sekuensing secara menyeluruh dari fragmen DNA hasil perbanyakan melalui proses PCR perlu dilakukan.

Berdasarkan permasalahan di atas, maka penelitian ini dimaksudkan untuk memverifikasi kemungkinan terjadinya misinkorporasi pada gen pengkode protein amplop dari virus dengue strain

CH53489 (gene E) yang telah diperbanyak melalui proses PCR. Hal ini sebagai upaya memasukkan 2 situs restriksi khusus sehingga dapat dimasukkan ke dalam vektor ekspresi pMAL-p2x. Dampak dari terjadinya misinkorporasi selama proses PCR, akan dikaji untuk menentukan seberapa jauh mutasi tersebut memengaruhi pemakaian gen hasil amplifikasi PCR tersebut yang nantinya digunakan sebagai bahan vaksin atau bahan diagnostik. Proses verifikasi dilakukan dengan mendesain beberapa primer spesifik yang dapat dipakai untuk mensekuens secara penuh gen E. Proses desain primer akan dioptimalkan dengan menggunakan beberapa program komputer seperti *Oligo Explorer* dan *Genetyx*. Sedangkan analisa sekuens untuk melihat persamaan dan perbedaannya dengan sekuens gene E yang ada di GenBank dengan menggunakan program BlastN ([www.ncbi.nih.gov](http://www.ncbi.nih.gov)) (Robinson, 2005). Hasil dari penelitian ini diharapkan dapat menjadi penunjang program pengekspresian gen pengkode protein amplop dari virus dengue strain CH53489 (*gene E*) di *E. coli*. Protein amplop dari virus dengue strain CH53489 yang diproduksi secara massal tersebut dapat dipakai sebagai bahan vaksin ataupun bahan diagnostik untuk menanggulangi penyakit demam berdarah dengue.

## BAHAN DAN METODE

Sepuluh 10  $\mu$ L cDNA hasil proses transkripsi terbalik dari RNA (RT-PCR) virus dengue strain CH53489 didapat dari Departemen Mikrobiologi, Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia. cDNA tersebut disimpan di dalam vektor plasmid pBS-SKII (Invitrogen).

Reagen-reagen molekuler yang dipakai dalam penelitian ini antara lain adalah reagen PCR (Invitrogen), *Platinum tag polymerase* (Invitrogen) dan Qiagen Gel Purification Kit (Qiagen). Metode dasar molekuler seperti PCR, *electrophoresis DNA* dan *Big Dye sequencing* dilakukan sesuai metode yang dipakai oleh Sambrook dan Russel (2001).

Beberapa program komputer yang dipakai dalam penelitian ini antara lain *OligoExplorer* (MedProbe), *Genetyx* (Software Development), *FastPCR* (University of Helsinki), *ABI 3130 Genetic Analyzer* and *BLAST* (NCBI).



Primer-primer didesain menggunakan program komputer *OligoExplorer* dan *Genetyx*. Primer-primer yang terpilih melalui kedua program tersebut disimulasikan untuk proses PCR *in silico* menggunakan program komputer *FastPCR* dalam rangka memeriksa apakah primer-primer tersebut telah menempel di situs yang spesifik pada cetakan DNA dan dapat menghasilkan fragmen dengan ukuran sesuai prediksi. Primer-primer terpilih kemudian dipakai dalam proses PCR menggunakan *thermal cycler* pada kondisi: [94°C - 4 menit, 94°C - 4 menit, 57°C - 30 detik, 72°C - 1 menit] X 25 siklus dan 72°C - 20 menit]. Produk PCR yang didapat kemudian dianalisa dengan menggunakan Agarose gel 1% (w/v), tegangan listrik sebesar 110 volt dan pewarnaan Etbr 20 µg/µl. Untuk mengetahui ukuran fragmen, dipakai 1 Kb plus Ladder (InVitrogen) sebagai marker.

cDNA diamplifikasi dengan pasangan primer yang telah ditambahkan situs restriksi khusus pada ujung-ujungnya. Hasil amplifikasi pada gel dipotong dan dimurnikan menggunakan Qiagen Gel Purification Kit (Qiagen). Amplikon kemudian disekuens dengan primer-primer yang telah didesain sebelumnya. Hasil sekuens yang didapat dibandingkan dengan sekuens gen pengkode protein amplop dari virus Dengue strain CH53489 sequences (*gene E*) yang ada di GenBank menggunakan program BlastN ([www.ncbi.nih.gov](http://www.ncbi.nih.gov)) (Robinson, 2005). Sekuens dari amplikon yang didapat dari proses PCR dan sekuens *gene E* dari GenBak kemudian ditranslasikan menjadi asam amino dan struktur 3 dimensi. Protein yang didapat disimulasikan dan dibandingkan untuk melihat apakah perubahan pada sekuens akibat proses PCR terjadi pada daerah

penting protein amplop virus tersebut. Keadaan ini nantinya akan berpengaruh pada aplikasinya baik sebagai vaksin maupun alat diagnostik.

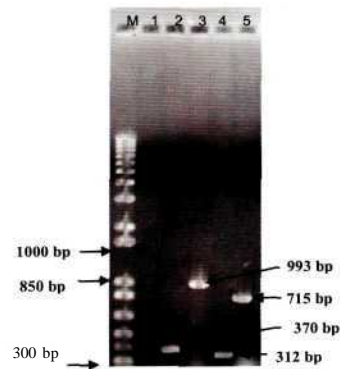
## HASIL

Berdasarkan hasil simulasi program-program komputer yang digunakan, maka didapat 6 primer yang paling memenuhi syarat untuk mendapatkan sekuens dari gen pengkode protein selubung dari virus dengue strain CH53489 sequences (*gene E*) secara penuh. Keenam primer tersebut dianalisa dengan program PCR *FastPCR* (University of Helsinki) terbukti mampu menempel secara spesifik pada cetakan yang akan digunakan sehingga mampu memproduksi satu amplikon spesifik dengan ukuran sesuai prediksi. Tiga pasang primer didesain dengan program *OligoExplorer* (MedProbe) (DenVM F, d3-1288c & d3-1911c) sedangkan sisanya (d3-1715s, d3-2117s & DenVM R) dengan program *Genetyx* (Software Development). Daerah target dari sekuensing gen E ini meliputi 1500 pasang basa. Keenam primer tersebut disajikan pada Tabell.

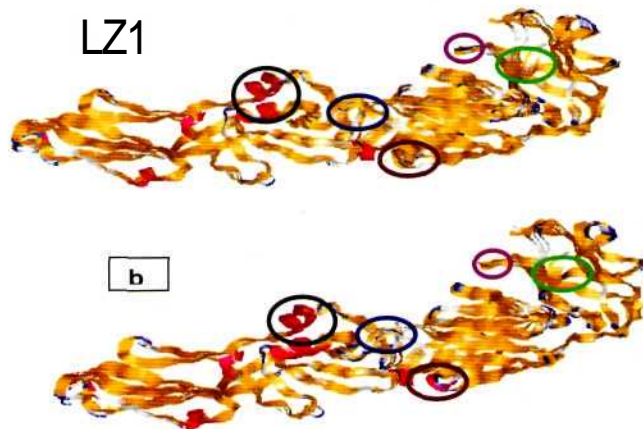
Proses PCR secara *In vitro* yang dilakukan, hasilnya dapat dilihat seperti pada Gambar 1. Pada Gambar 1, terlihat bahwa pemakaian kombinasi keenam primer tersebut dapat menghasilkan satu amplikon yang mengindikasikan bahwa keenam primer tersebut dapat menempel secara spesifik pada cetakan. Lebih lanjut, ukuran dari amplikon yang dihasilkan telah sesuai dengan prediksi hasil analisa dengan program komputer *FastPCR*. Berdasarkan hasil tersebut, maka keenam primer tersebut digunakan untuk mensekuens gen target pengkode protein amplop dari virus dengue

**Tabel 1.** Enam macam primer DNA yang didesain dan berhasil mengamplifikasi fragmen gen pengkode protein selubung dari virus dengue strain CH53489

No	Nama primer	Susunan basa	Panjang fragmen yang dihasilkan
1	DenVMF (Forward) & d3-1288c (Reverse)	5'TAGAGGATCCGCAATGAGATGCGTGGGAGTAGG-3' (mengandung situs <i>Bam</i> HT) & 5'-TTCGCGATGTCACCAAG-3'	370 bp
2	DenVMF (Forward) & d3-1911c (Reverse)	5'TAGAGGATCCGCAATGAGATGCGTGGGAGTAGG-3' (mengandung situs <i>Bam</i> HI) & 5'CTTTGTAICTAACCTTAATGA-3'	993 bp
3	d3-1715s (Forward) & DenVM R (Reverse)	5'-GCACTGACAGGAGCTACAGA 3' & 5' AAGCTTGTGCGACGTCAGCTTGTACCACGGCTCC-3' (mengandung situs <i>Sai</i> l)	715 bp
4	DenVM R (Reverse) & d3-2117s (Forward)	5'AAGCTTGTGCGACGTCAGCTTGTACCACGGCTCC-3' (mengandung situs <i>Sai</i> l) & 5'-CGATTGGGAAGATGTTCTGA-3'	312 bp



**Gambar 1.** Amplifikasi dengan proses PCR menggunakan pasangan primer terpilih (M: 1 Kb plus ladder marker; 1: Kontrolnegatif; 2: DenVM F andd3-1288c, 3: DenVMF andd3-191 lc, 4: DenVM R andd3-2117s, 5: DenVMR andd3-1715s)



**Gambar 2.** Struktur 3-D protein hasil translasi DNA melalui proses PCR (a) dan DNA yang ada di GenBank (b)

strain CH53489 sequences (*gene E*).

Primer-primer terpilih tersebut mampu digunakan untuk proses sekuensing dan menghasilkan sekuens berkualitas yang dapat dibaca sampai 400 pasang basa.. Hasil sekuensing dengan proses *Big Dye sequencing* yang dapat dibaca biasanya sekitar 300 pasang basa dimana maksimum pembacaan sekitar 400 pasang basa. Situs-situs restriksi *BamHI* dan *SaiI* yang diintroduksi melalui proses PCR dalam rangka mengakomodasi pengklonan ke dalam vektor ekspresi pMAL-p2X telah tergabung ke dalam DNA hasil amplifikasi melalui proses PCR (data tidak ditampilkan). Secara keseluruhan terlihat adanya persamaan (homology) sebesar 98.9% karena terdapat sedikit pasangan basa yang berubah atau hilang. Hasil pencocokan di tingkat asam amino mencapai 94% jika dibandingkan dengan sekuens asam amino dari gen

tersebut yang tercatat di GenBank. Terdapat sekitar 6 asam amino yang tidak sesuai.

Adapun prediksi struktur 3 dimensi dari DNA hasil PCR dan DNA yang ada di GenBank yang ditranslasikan secara simulasi dapat dilihat pada Gambar 2.

Data pada Gambar 2 menunjukkan bahwa secara menyeluruh tidak ada perubahan konformasi dari struktur 3 dimensi dari protein selubung virus Dengue strain CH53489. Namun terlihat adanya perubahan minor pada daerah-daerah yang ditandai dengan lingkaran berwarna (Gambar 2).

## PEMBAHASAN

Primer-primer dirancang dengan memperhatikan beberapa faktor antara lain jumlah nukleotida (18-30 pasang basa), suhu *annealing* yang idealnya berkisar

antara 45°C - 70°C, kandungan GC pada primer yang idealnya berkisar antara 40% - 65% dan nukleotida terakhir yaitu G atau C (Sambrook and Russel, 2001). Program komputer *OligoExplorer* dan *Genetyx* (Software Development) memberikan output yang cukup lengkap yaitu desain primer beserta semua spesifikasinya antara lain, suhu leleh ( $T_m$ ), persen GC, stabilitas ujung 3'. Hal ini untuk menghindari kemungkinan primer untuk menempel pada dirinya sendiri (*self annealing*) dan terjadinya penempelan internal yang mengakibatkan terbentuknya struktur jepit rambut (*hairpin loops*). Berdasarkan analisa dengan program komputer *OligoExplorer* (MedProbe) dan *Genetyx* (Software Development), keenam primer tersebut memenuhi persyaratan.

Penambahan situs restriksi adalah satu-satunya cara untuk memungkinkan gen target dapat dimasukkan ke dalam vektor ekspresi di *Escherichia coli* yaitu pMAL-p2x (New England Biolabs). Hal ini dikarenakan tidak ada vektor lain yang dapat dipakai untuk mengambil kedua situs tersebut dengan posisi *BamHI* pada ujung 5' and *SaiI* pada ujung 3'. Kedua situs ini dipilih karena keduanya berada pada situs multi kloning dari vektor ekspresi pMAL-p2x. Dengan demikian, menempatkan *BamHI* di ujung 5' dan *SaiI* di ujung 3' maka gen target dapat diekspresikan dengan orientasi yang benar. Alasan lainnya adalah kedua situs tersebut tidak dijumpai pada gen target sehingga pemotongan dengan kedua situs tersebut tidak akan mengganggu keutuhan dari gen target. Adapun alasan terakhir adalah penambahan ekstra nukleotida tidak akan mempengaruhi proses annealing sebuah primer (Saiki, 1992).

Primer-primer yang telah didesain tersebut dipasang-pasangkan. Kombinasi pasangan primer tersebut dianalisa secara simulasi menggunakan program komputer *FastPCR* untuk memprediksi besar fragmen yang dihasilkan jika proses PCR dilakukan. Berdasarkan analisa program komputer *FastPCR*, pasangan primer DenVM F dengan d3-1288c akan menghasilkan sebuah fragmen sebesar 370 bp, pasangan primer DenVM F dengan d3-1911c akan menghasilkan sebuah fragmen sebesar 993 bp, pasangan primer DenVM R dengan d3-1715s akan menghasilkan sebuah fragmen sebesar 715 bp dan

pasangan primer DenVM R dengan d3-2117s akan menghasilkan sebuah fragmen sebesar 312 bp. Kesemua kombinasi tersebut dapat mengakomodasi sekuensing secara penuh dari gen target (Robinson, 2005).

Gambar 1 menunjukkan bahwa kesemua primer dapat menempel secara spesifik pada cetakan DNA sehingga tidak dijumpai adanya pita-pita tambahan sebagai indikasi ketidak-spesifikan primer tersebut. Data pada Gambar 1 menunjukkan amplicon dengan panjang sesuai prediksi yang mengkonfirmasi hasil simulasi dengan program komputer *FastPCR*. Secara teoritis, maka primer-primer ini dapat dipakai untuk mendapatkan sekuens secara penuh dan dapat pula digunakan untuk menghasilkan sekuens dengan kualitas baik yang dapat terbaca hingga 400 bp. Kombinasi pasangan primer-primer internal ini nantinya juga akan berguna untuk mengambil daerah di dalam gen target yang bersifat immunogenik. Hal ini akan sangat membantu penelitian lanjutan berupa pemetaan epitope dari protein amplop virus Dengue serotipe 3 strain CH53489.

Analisa kecocokan pada tingkat nukleotida menunjukkan terjadinya peristiwa misinkorporasi nukleotida-nukleotida selama proses PCR berlangsung. Hal ini agak mengejutkan karena walaupun menggunakan Platinum Taq Polymerase yang mempunyai akurasi tinggi masih saja terjadi mutasi. Sebagai akibatnya kecocokan di tingkat nukleotida hanya mencapai 98.9% dan di tingkat asam amino 94%. Terdapat dua kemungkinan yang dapat menyebabkan terjadinya fenomena ini. Pertama adalah telah terjadi mutasi pada RNA virus Dengue yang dikoleksi di lapang sebelum RNA tersebut diubah menjadi cDNA melalui proses transkripsi terbalik. Laju mutasi pada virus sangat tinggi terutama virus yang mempunyai RNA sebagai materi genetik seperti virus Dengue (Chang *et. al.*, 1995). Kedua adalah kemungkinan terjadi misinkorporasi walaupun menggunakan enzim Taq Polymerase yang mempunyai keakuratan tinggi seperti Platinum Taq Polymerase. Penggunaan enzim Platinum Taq Polymerase meningkatkan akurasi sebanyak 6 kali lipat jika dipakai untuk mengamplifikasi DNA dengan ukuran 1.0-1.5 kb. Namun demikian, polymerase ini masih mempunyai kemungkinan

misinkorporasi sebesar 11-57% (Stratagene, 2004).

Gambar 2 menunjukkan bahwa secara keseluruhan struktur 3 dimensi dari protein hasil translasi dari gen yang diperbanyak melalui PCR hanya mengalami perubahan minor. Sebagai tambahan, Gambar 2 juga menunjukkan bahwa konformasi protein tidak berubah. Menurut Klug and Cummings (1994), perubahan asam amino akibat substitusi nukleotida dapat ditolerir pada kondisi sebagai berikut 1) Substitusi nukleotida tidak mengubah asam amino yang dikodekan, 2) Apabila asam amino berubah, maka perubahan yang terjadi tidak pada situs aktif protein tersebut, dan 3) Apabila asam amino berubah, maka perubahan yang terjadi tidak memengaruhi fungsi protein tersebut.

Berdasarkan hasil penelitian ini, protein hasil translasi gen pengkode protein amplop dari virus dengue strain CH53489 yang diperbanyak melalui proses PCR hanya mengalami perubahan minor tanpa mengubah konformasinya. Produk amplifikasi tersebut dapat diekspresikan ke dalam vektor ekspresi pMAL-p2x. Meskipun demikian masih dibutuhkan studi lanjutan mengenai daerah-daerah immunogenik dari gen tersebut secara lebih mendalam jika akan dipakai dalam produksi vaksin.

#### KESEMPULAN

Enam primer hasil desain menggunakan program komputer *OligoExplorer* (MedProbe) dan *Genetyx* (Software Development) terbukti mampu mengamplifikasi dan mensekuen gen pengkode Protein amplop dari virus dengue strain CH53489 (gene E) yang telah diperbanyak melalui proses PCR.

#### DAFTAR PUSTAKA

- Chang GJ, BC Cropp, RM Kinney, DW Trent and DJ Gubler. 1995.** Nucleotide sequence variation of the envelope protein gene identifies two distinct genotypes of yellow fever virus. *Journal of Virology* **69(9)**, 5773-5780.
- Chaturvedi UC and R Shrivastava. 2004.** uengut haemorrhagic fever: A global challenge. *Indian Journal of Medical Microbiology* **22(1)**, 5-6.
- Guirakhoo F, Z Zhang, G Myers, BW Johnson, K Pugachev, R Nichols, N Brown, I Levenbook, K Draper, S Cyrek, J Lang, C Fournier, B Barrere, S Delagrave and TP Monath. 2004.** A single amino acid substitution in the envelope protein of chimeric yellow fever-dengue 1 vaccine virus reduces neurovirulence for suckling mice and viremia/viscerotropism for monkeys. *Journal of Virology* **78(18)**, 9998-10008.
- Gyllensten U. 1992.** Direct sequencing of *in vitro* amplified DNA. In: HA Erlich (Ed.) *PCR technology: Principles and Applications for DNA Amplification*, 45-60. WH Freeman and company, New York.
- Invitrogen. 2005.** Platinum\* *Taq DNA Polymerase High Fidelity*. Product Manual. USA.
- Julian K-CMa, E Barros, R Bock, P Christou P, PJ Dale, PJ Dix, R Fischer, J Irwin, R Mahoney, M Pezzotti, S Schillberg, P Sparrow, E Stoger and RM Twyman. 2005.** Molecular farming for new drugs and vaccines: Current perspectives on the production of Pharmaceuticals in transgenic plants. *EMBO Reports* **6(7)**, 593-599.
- Klug WS and MR Cummings. 1994** *Concept of Genetics*, 15-35. 4<sup>th</sup> ed. Prentice Hall, New York.
- Robinson AJ, CG Love, J Batley, G Barker and D Edwards, D. 2005.** Simple sequence repeat marker loci discovery using SSR primer. *Bioinformatics*, **20**, 1475-1476.
- Russell PJ. 1994.** *Fundamentals of Genetics*, 79-87. Harper Collins College Publishers, New York.
- Saiki RK. 1992.** The design and optimization of the PCR. In: HA Erlich (Ed.) *PCR technology: Principles and Applications for DNA Amplification*, 7-16. WH Freeman and company, New York.
- Sambrook J and DW Russell. 2001.** *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* 3<sup>rd</sup> ed, 256-287. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Stratagene. 2004.** Easy-A<sup>TM</sup> high-fidelity PCR cloning enzyme and master mix. *Technical Profile*, 35-59. La Jolla, USA.