

Ekspresi dan Purifikasi Protein Rekombinan Non-Struktural NS1 Virus Dengue Serotipe 1 Strain Indonesia Pada *Pichia Pastoris*

C. S. Whinie Lestari¹, Vanny Narita², Tjahjani Mirawati Soediro³,
Agus Sjarurachman³

¹Puslitbang Biomedis dan Teknologi Dasar Kesehatan, Balitbangkes, Kemenkes

²BPPT, Kemenristek, ³Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia

Email: whinielestari@yahoo.com

Abstract

Dengue infection remains a public health problem in Indonesia. In the framework of the independence of the national product, pursued research and development of raw materials that can be used for diagnostic kit and vaccine candidates. The objective of this study was to express and purify recombinant proteins non-structural NS1 dengue virus serotype 1 (DENV-1) of Indonesia strain (915 846) in Pichia pastoris expression system with "halal" system that can be used for the development of diagnostic kits and vaccines. The dengue virus serotype 1 strain Indonesia (915846) was used to construct the NS1 DENV-1 gene by PCR. Then NS1 DENV-1 gene cloned into the vector pPICZαB and transformed into Pichia pastoris yeast cells, then verified with sequencing. Recombinant protein NS1 DENV-1 was secreted expression in P. pastoris. Characterization of antigenicity was did by ELISA, Western Blot and purified by the method of metal-chelating affinity chromatographic (MCAC) column. The recombinant protein with a size of 45 kDa secreted into the supernatant of P. pastoris with methanol induction and purified. The recombinant protein can bind to monoclonal antibodies and serum of patients infected with dengue virus serotype 1. These results indicate that the recombinant protein NS1 DENV-1 strain Indonesia (915 846) can be produced efficiently in P. pastoris secreted expression system is halal and still functional as an antigen that can be used for the development of diagnostic kits and vaccines.

Keywords: NS1, dengue virus, serotype 1, Indonesia strain, *P. pastoris*.

Abstrak

Infeksi dengue masih menjadi masalah kesehatan masyarakat di Indonesia. Dalam rangka kemandirian produk nasional, diupayakan penelitian dan pengembangan bahan baku yang dapat digunakan untuk kit diagnostik dan kandidat vaksin. Tujuan penelitian ini adalah mengekspresikan dan mempurifikasi protein rekombinan non-struktural NS1 virus dengue serotipe 1 (DENV-1) strain Indonesia (915846) di sistem ekspresi *Pichia pastoris* dengan sistem yang halal yang dapat digunakan untuk pengembangan kit diagnostik dan vaksin. Virus dengue serotipe 1 strain Indonesia (915846) digunakan untuk membuat konstruksi gen NS1 dengan metode PCR. Kemudian produknya di cloning ke vektor pPICZαB, ditransformasi ke sel yeast *Pichia pastoris* kemudian diverifikasi dengan sekuensing. Selanjutnya protein rekombinan dilakukan ekspresi secara sekresi di *P. pastoris*, uji antigenisitas dengan metode ELISA, Western Blot dan purifikasi dengan metode *metal-chelating affinity chromatographic (MCAC) column*. Protein rekombinan dengan ukuran 45 kDa disekresikan ke supernatan *P. pastoris* dengan induksi methanol dan dipurifikasi. Protein rekombinan tersebut dapat mengikat antibodi monoklonal dengue dan serum pasien terinfeksi dengue serotipe 1. Hasil ini menunjukkan bahwa protein rekombinan NS1 DENV-1 strain Indonesia (915846) dapat diproduksi secara efisien di sistem ekspresi tersekresi *P. pastoris* yang halal dan masih fungsional sebagai antigen yang dapat digunakan untuk pengembangan kit diagnostik dan vaksin.

Kata kunci: NS1, virus dengue, serotipe 1, strain Indonesia, *P. pastoris*.

Pendahuluan

Virus dengue (DENV) ditularkan ke manusia melalui gigitan nyamuk yang telah terinfeksi terutama jenis nyamuk *Aedes aegypti* dan *Aedes albopictus*. Virus dengue termasuk dalam genus *Flavivirus*, famili *Flaviviridae*, terdiri dari 4 serotipe

(DENV-1, DENV-2, DENV-3, dan DENV-4).^{1,2} Infeksi dengue masih menjadi salah satu masalah kesehatan utama di dunia terutama di daerah tropis dan subtropis di kawasan Asia Tenggara, Pasifik dan Amerika. *World Health Organization (WHO)* memperkirakan infeksi dengue di dunia berkisar 50-100

juta setiap tahun pada lebih dari 100 negara endemis dan hampir setengah dari penduduk dunia tinggal di negara yang endemis infeksi dengue.³⁻⁶ Pengendalian infeksi dengue merupakan salah satu program prioritas utama di bidang kesehatan di Indonesia. Rencana strategis (renstra) Kementerian Kesehatan tahun 2015-2019 sasaran ke 2 adalah menurunnya angka kesakitan akibat penyakit menular dengan salah satunya yaitu angka kesakitan DBD menjadi kurang dari 49 per 100.000 penduduk, sehingga diperlukan pendekatan baru untuk memecahkan masalah tersebut.⁷

Virus dengue merupakan virus positive sense RNA rantai tunggal, dengan panjang genom 10.600 nukleotida, mengkode 3.400 asam amino yang terdiri dari 3 protein struktural dan 7 protein non struktural. Protein Non Struktural 1 terdiri dari 352 asam amino dengan berat molekul 40-46 kDa. Ekspresi NS1 dalam pejamu dapat terikat membran sel atau disekresikan dalam sirkulasi dan keduanya dapat berikatan dengan antibodi spesifik dan selanjutnya dapat mengaktivasi komplemen. NS1 ditemukan bersirkulasi di serum pasien terinfeksi DENV, menunjukkan bahwa sekresi NS1 merupakan hal penting pada infeksi flavivirus di tubuh manusia.⁸ Glikoprotein NS1 ada di seluruh flavivirus dan berperan penting untuk replikasi dan viabilitas virus. NS1 intraseluler terlibat pada fase awal replikasi virus dengan retensinya pada organel intraseluler dari sel terinfeksi dan kemampuannya berinteraksi dengan membran. Namun NS1 intraseluler yang berhadapan dengan lumen retikulum endotelial mungkin berperan secara tidak langsung pada proses replikasi. Dimerisasi juga merupakan prasyarat protein NS1 keluar melalui jalur sekresi menuju membran plasma, dan berdiam sebagai protein virus yang unik pada permukaan sel terinfeksi.⁹

NS1 digunakan sebagai antigen yang penting bagi pengembangan vaksin dengue

dan juga sebagai reagen untuk diagnosis cepat dengue.⁹⁻¹² Epitop NS1 DENV yang bersifat imunogenik berperan sebagai target antibodi untuk pengembangan vaksin maupun kit diagnostik cepat telah banyak dilaporkan.¹³⁻¹⁸ Studi pengembangan vaksin protein rekombinan NS1 pada beberapa penelitian menunjukkan bahwa NS1 sangat imunogenik serta dapat menimbulkan antibodi protektif dengan aktivasi komplemen untuk membunuh target sel yang terinfeksi.¹⁹⁻²⁰ Protein NS1 efektif tanpa menimbulkan risiko fenomena *antibody dependent enhancement (ADE)* yang mungkin disebabkan reaksi antibodi non netralisir terhadap protein struktural E virus. Protein NS1 dapat menginduksi kekebalan seluler dan humoral jangka panjang.^{8,19-20}

Penelitian ini bertujuan untuk memproduksi protein rekombinan NS1 virus dengue serotipe 1 (DENV-1) strain Indonesia (915846) dengan sistem ekspresi tersekresi di *Pichia pastoris* dengan sistem yang halal yang dapat digunakan untuk pengembangan vaksin. Sistem halal yang dimaksudkan adalah menggunakan bahan-bahan reagensia yang bebas *porcine*, dimulai sejak dilakukan isolasi virus dengue menggunakan sel C6/36 hingga sistem ekspresi protein rekombinan. Isu halal merupakan salah satu isu penting untuk negara Indonesia dan negara lain yang mayoritas penduduknya umat muslim. Protein NS1 dengue yang dihasilkan juga dapat dimanfaatkan untuk pengembangan kit diagnostik dengue. Penelitian ini telah mendapat persetujuan etik (*Ethical Approval*) dari Komisi Etik Penelitian Kesehatan Badan Litbang Kesehatan dengan nomer: KE.03.02/EC/4537 /2009, tanggal 24 Juni 2009 dan nomer: KE.03.02/EC/5025/2010 tanggal 17 Juni 2010.

Metode

Penyiapan virus dengue serotipe 1 (DENV-1) strain Indonesia (915846).

Sel monolayer C6/36 (Cloned Sing's *Aedes albopictus* line) American type cell line collection (ATCC, CRL-1560) pada media MEM dengan Earle's salts dan L-glutamin (Gibco cat no. 61100-061) ditambah 2% fetal bovine serum (Gibco cat. no. 10100-139) diinfeksi dengan DENV-1 strain Indonesia (915846). Setelah diinkubasi pada suhu 28°C selama 1 minggu, sel kultur dipanen dan RNA virus diekstraksi menggunakan QIAamp® viral RNA isolation kits (Qiagen cat. no. 52906). Prosedur isolasi RNA mengikuti panduan dari protokol kit yang digunakan.

Sintesis cDNA

cDNA virus dengue disintesis menggunakan SuperScript® VILO™ cDNA Synthesis Kit (Invitrogen cat. No 11754-050). Komposisi reaksi mengikuti panduan yang terdapat pada protokol, terdiri dari 4 µl 5x VILO reaction mix (merupakan campuran yang sudah tersedia di dalam kit, terdiri dari random primers, MgCL2, dNTPs didalam dapar yang telah diformulasi optimal oleh produsen), 2 µl 10X SuperScript® enzyme mix (merupakan campuran yang sudah tersedia didalam kit yang mengandung SuperScript® III RT, RNaseOUT™ Recombinant Ribonuclease Inhibitor dan sejumlah protein pembantu yang sesuai), 5 µl RNA (sampai 2,5 µg), tambahkan DEPC-treated water sampai volume 20 µl. Kemudian diinkubasi di mesin thermal cycler (Biorad C1000) pada suhu 25°C selama 10 menit, 42°C selama 60 menit dan penghentian reaksi pada suhu 85°C selama 5 menit.

Konstruksi plasmid rekombinan (pPICD1NS1)

Amplifikasi gen NS1 DENV-1 strain Indonesia (915846) dengan teknik PCR menggunakan forward primer: 5'GCGGCCGACGACTCGGGATGTG

TAGTCAACT3' dengan posisi nukleotida 2409–2430 dan reverse primer: 5'TCTAGAGCTGCAGAGACCATTTGAC TT3' dengan posisi nukleotida 3446 - 3464. Kedua primer dirancang memiliki situs restriksi *NotI* pada primer forward dan *XbaI* pada primer reverse. Protokol PCR menggunakan enzim Platinum Taq Polymerase (Invitrogen cat no. 10966-018). Campuran reaksi yang digunakan adalah: 5 µl 10x PCR buffer, -Mg, 1 µl 10 mM dNTP mix, 1,5 µl 50 mM MgCl₂, 1 µl 10 µM primer forward, 1 µl 10 µM primer reverse, 0,2 µl enzim Platinum Taq Polymerase (2 unit) dan 1 µl cDNA (400 ng), kemudian ditambahkan air sampai volume 50 µl. Reaksi PCR yang digunakan adalah denaturasi awal 94°C selama 2 menit; 35 siklus yang terdiri dari denaturasi pada 94°C selama 30 detik, annealing pada 55°C selama 30 detik, dan ekstensi 72°C selama 1 menit. Amplifikasi dilakukan pada mesin Thermal Cycler (Biorad C1000). Produk PCR selanjutnya dipurifikasi menggunakan Wizard SV Gel and PCR Clean-up system (Promega cat. no. A9281) mengikuti panduan yang terdapat pada protokol. Gen sisipan NS1 DENV-1 dan plasmid pPICZαB yang telah disiapkan sebelumnya dipotong menggunakan enzim restriksi endonuklease *NotI* (Thermo scientific cat. no. ER 0591) dan *XbaI* (Thermo scientific cat. No. ER 0681) yang ditambahkan pada primer pengamplifikasi gen sisipan. Prosedur kerja dilakukan sesuai protokol enzim restriksi pada kit yang telah dioptimasi. Pemotongan dilakukan dengan campuran reaksi berupa 600 ng DNA (masing-masing gen sisipan atau vektor) ditambahkan 1 µl dapar reaksi 3, 0,2 µl Not I (10 U/µl) dan DW hingga volume akhir 10 µl. Campuran kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 1,5 jam dan reaksi dihentikan melalui pemanasan pada suhu 65 °C selama 10 menit. Hal yang sama juga dilakukan untuk pemotongan enzim ke 2 yaitu dengan menambahkan 1 µl dapar reaksi 2, 0,3 µl Xba I (10U/ µl) dan DW hingga volume

akhir 10 μ l. Gen NS1 dan plasmid pPICZ α B yang telah dipotong dengan enzim restriksi, masing-masing dilakukan purifikasi menggunakan *Wizard SV Gel and PCR Clean-up system kit* (Promega cat. no. A9281). Prosedur kerja sesuai dengan protokol pada kit. Gen NS1 disisipkan ke vektor pPICZ α B dengan cara reaksi ligasi menggunakan enzim T4 DNA ligase (Invitrogen cat. No. 15224-017). Prosedur ligasi dilakukan sebagai berikut: perbandingan gen NS1 dengan plasmid PICZ α B adalah 5:1. Reaksi dilakukan dengan campuran 5x buffer T4 DNA ligase, 3 Unit enzim T4 DNA ligase dan DW sampai volume total 30 μ l. Reaksi ligasi dilakukan pada suhu 16 °C selama 16 jam. Ligasi berjalan melalui penyisipan gen NS1 ke *multiple cloning site* plasmid pPICZ α B di antara situs restriksi Not I dan Xba I. Hasil ligase dipurifikasi menggunakan *Wizard SV Gel and PCR Clean-up system kit* (Promega cat. no. A9281). Kemudian ditransformasikan ke dalam *E.coli strain* TOP10F untuk menghasilkan plasmid rekombinan. Prosedur transformasi dilakukan dengan metode *electric shock* menggunakan electroporator (Bio-Rad GenePulser). Hasil transformasi kemudian dianalisa dengan seleksi klon menggunakan metode isolasi DNA plasmid, digesti sesuai fragmen restriksi, PCR menggunakan primer spesifik NS1, primer vektor AOX1 dan sekuensing. Plasmid rekombinan pPICZ α B yang mengandung gen NS1 selanjutnya disebut pPICD1NS1.

Transformasi plasmid rekombinan ke *Pichia pastoris* dan penentuan fenotif Mut

Plasmid rekombinan pPICD1NS1 dilinearisasi menggunakan enzim *SacI* (Thermo scientific cat. no. ER1131), kemudian ditransformasi ke *Pichia pastoris* strain GS 115 dengan metode electroporasi (Gene Pulser-Biorad). Sel *yeast* yang ditransformasi diinkubasi pada media agar YPDS yang mengandung

Zeocin (100 μ g/ml) pada suhu 30°C selama 3-5 hari. Untuk isolasi *multicopy recombinant*, hasil transformasi diinkubasi pada agar YPDS yang mengandung 500 μ g/ml Zeocin. Selanjutnya hasil transformasi dianalisa dengan PCR menggunakan primer spesifik NS1, primer vektor AOX1 untuk mengetahui gen NS1 terintegrasi pada lokus *alcohol oxidase promotor* (AOX1) di kromosom *P. pastoris*. Kemudian dilanjutkan dengan penentuan fenotip yaitu dengan menumbuhkan koloni hasil transformasi di *replica-plate* pada media minimal methanol histidin (MMH) dan minimal dextrose histidin (MDH) dan diinkubasi pada 30°C selama 2-3 hari. Fenotip *methanol utilization-plus transformant* (*Mut*⁺) adalah jika *strain* tumbuh dengan normal pada kedua plate MMH dan MDH. Analisis dilanjutkan dengan sekuensing untuk mengetahui susunan asam nukleat dan kemungkinan terjadi mutasi.

DNA sekuensing analisis plasmid rekombinan dan *P. pastoris* rekombinan

Plasmid rekombinan dan *P. pastoris* rekombinan dianalisa dengan sekuensing metode Sanger menggunakan mesin sekuens otomatis AB 3130 XL. Primer yang digunakan adalah α -Factor : 5' TA CTATTGCCAGCATTGCTGC 3', 3'AO X1 : 5'GCAAATGGCA TTCT GACAT CC 3' serta sepasang primer spesifik NS1. Selanjutnya hasil sekuen dianalisis secara manual menggunakan software FinchTV dan dibandingkan dengan sekuen asli NS1 DENV-1 strain Indonesia (915846).

Ekspresi protein rekombinan NS1

Media ekspresi yang digunakan adalah *buffered glycerol-complex medium* (BMGY) yang terdiri dari *yeast extract* (Oxoid cat. No. LP0021) 1%, *peptone* (Sigma-Aldrich cat. no. 91249) 2%, *potassium phosphate* (Merck cat. no 104873) pH 6,0 100 mM, *yeast nitrogen base* (YNB) (Invitrogen cat. no. Q3009) 1,34%, Biotin (Sigma-Aldrich cat. no.

B4639) $4 \times 10^{-5}\%$, glycerol (Invitrogen cat. no. 15-514-029) 1%, sedangkan media induksi menggunakan BMMY yaitu mengganti glycerol dengan metanol 1%. Sepuluh klon hasil transformasi yang sudah diverifikasi, ditumbuhkan ke media ekspresi selama 16-18 jam pada suhu 28°C dan kemudian inkubasi dilanjutkan selama 72 jam dengan induksi metanol 1% setiap 24 jam. Sebagai kontrol, dilakukan juga kultur pada *Pichia pastoris* strain GS 115 yang tidak ditransformasi dan sebagai kontrol negatif pada transforman vektor pPICZαB/GS 155.

SDS-PAGE dan Western Blotting

50 µl sampel dicampur dengan 50 µl 2x SDS-PAGE *gel loading buffer* (dapar sampel), dipanaskan pada suhu 100°C selama 10 menit kemudian disepariasi dengan 12% jel SDS PAGE pada mesin elektroforesis vertikal (Biorad). Pita protein diwarnai dengan Coomassie Blue R-250 dan ukurannya ditentukan dengan membandingkan berat molekul standar (Thermo Scientific cat. no. 26616). Pita protein yang telah terpisah, ditransfer dari jel poliakrilamid ke membran nitroselulosa menggunakan mesin *semidry transblot blot* (Biorad). Membran dibloking dengan larutan 3% BSA (Sigma-Aldrich cat. no. A2058) dalam 1% PBS. Selanjutnya membran diinkubasi dengan larutan serum Ig G dengue positif 1:1600 (koleksi laboratorium) dengan komposisi larutan dilusi 0,5% BSA (Sigma-Aldrich cat. no. A2058) dalam PBS Tween 0,05%, diagitasi perlahan dan diinkubasi pada suhu 4°C semalam. Setelah itu membran dicuci dengan dapar pencuci PBS tween 0,05 % sebanyak 3 kali selama 5 menit dengan agitasi perlahan. Kemudian membran diinkubasi dengan antibodi ke 2 yaitu larutan *anti human HRP-IgG* (Sigma Aldrich cat. no. A.0170) 1:100, diagitasi perlahan selama 1 jam. Selanjutnya dicuci dengan dapar pencuci sebanyak 3 kali selama 5 menit sambil diagitasi perlahan. Terakhir direndam dengan substrat selama 5 menit dengan komposisi substrat 6 mg

DAB, 10 mL 1 x PBS, 10 µl H_2O , kemudian dilihat pita yang terbentuk pada kertas membran.

Purifikasi protein rekombinan NS1

Klon positif nomer 54 yang sudah dikonfirmasi mengekspresikan secara tersekresi protein rekombinan selanjutnya diekspresikan sesuai protocol. Supernatan yang mengandung protein rekombinan selanjutnya di sentrifugasi untuk memisahkan dengan sel *Pichia pastoris*. Kemudian dipekatkan menggunakan Amicon 10 kDa (Millipore), selanjutnya dipurifikasi menggunakan *ProBond Purification System* (Invitrogen). ProBond merupakan sistem purifikasi *metal chelating affinity chromatography* (MCAC) yang mengandung resin ion *nickel* untuk menangkap protein rekombinan yang sudah dirancang dengan 6 x His tag pada bagian ujungnya.

Pemeriksaan ELISA

Pengujian antigenisitas dilakukan juga dengan metode ELISA NS1 dengue (Platelia). Antibodi yang digunakan adalah antibodi monoklonal dengue yang diproduksi di mencit. Protokol kerja sesuai panduan kit. Reagen disiapkan pada suhu kamar sebelum digunakan. Larutan *conjugate anti NS1 HRP* didilusi 50 kali dengan larutan *diluent*. Percampuran dilakukan saat akan digunakan. Kontrol positif, kontrol negatif, kalibrator dan serum diencerkan dalam larutan *diluent*. Spesimen 10 µl didilusi dengan 1000 µl spesimen *diluent*. Dapar pencuci dincerkan 20x (1 bagian *wash buffer* + 19 bagian *aquabidest*). Masing-masing 100 µl kontrol, kalibrator dan spesimen yg sudah diencerkan dimasukkan ke dalam sumur dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 60 menit. Kemudian dicuci sebanyak 6x dengan dapar pencuci yang sudah diencerkan. Selanjutnya dimasukkan 100 µl campuran *conjugate anti NS1 HRP* ke setiap sumur, kecuali sumur blanko, lalu digoyang selama 5 detik. Plate ditutup dan diinkubasi kembali pada suhu 37°C selama

60 menit. Setelah itu dicuci kembali sebanyak 6x dengan dapar pencuci. Kemudian dimasukkan 100 µl TMB ke setiap sumur dan diinkubasi kembali pada suhu ruangan selama 10 menit. Untuk mengakhiri reaksi, ditambahkan 100 µl *stop solution* ke setiap sumur dan digoyang selama 30 detik, kemudian hasil reaksi dibaca pada mesin spektrofotometri (Biorad-America) dengan absorbansi pada 450 nm.

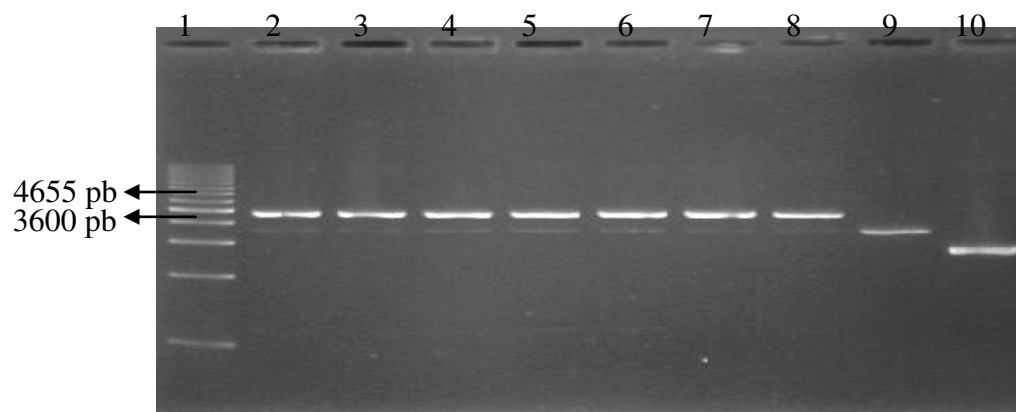
Hasil

Hasil konstruksi dan verifikasi plasmid rekombinan pPICD1NS1.

Verifikasi dilakukan dengan metode isolasi DNA, pemotongan dengan salah satu enzim restriksi dan PCR dengan primer spesifik NS1 dan primer vektor pPICZαB (AOX1) serta sekuensing DNA.

Plasmid rekombinan yang mengandung gen NS1 selanjutnya disebut pPICD1NS1.

Kebenaran ada tidaknya plasmid rekombinan pada koloni diverifikasi dengan isolasi DNA. plasmid rekombinan yang sudah tersisipi gen NS1 sehingga berukuran 4.655 pb, sedangkan plasmid yang tidak mengandung gen NS1 berukuran 3,6 kb (data tidak ditunjukkan). Selain itu verifikasi juga dilakukan dengan pemotongan plasmid rekombinan menggunakan salah satu enzim yaitu Xba I. Tampak pada gambar 1, di lajur 2-8 adalah plasmid rekombinan pPICD1NS1 yang telah tersisipi gen NS1 sehingga berukuran 4655 pb. Sedangkan lajur 9 adalah plasmid tanpa NS1 yang dipotong dengan enzim XbaI dan lajur 10 adalah plasmid tanpa NS1 yang belum dipotong.



Gambar 1.

Verifikasi hasil kloning plasmid rekombinan dengan pemotongan enzim Xba I. Lajur 1: marker 1 kb plus, lajur 2-8: plasmid rekombinan, pPICD1NS1, 4.655 pb, lajur 9: plasmid pPICZαB yang dipotong enzim, 3.600 pb, lajur 10: plasmid pPICZαB tanpa dipotong enzim.

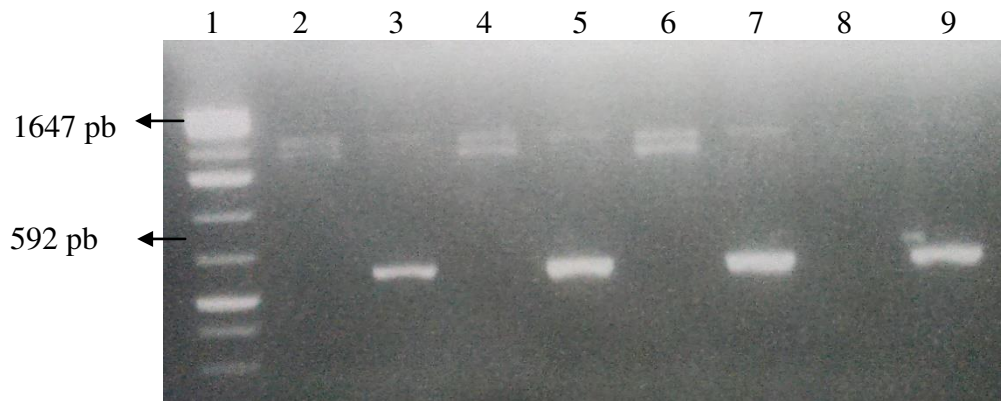
Verifikasi juga dilakukan dengan metode PCR koloni dimana reaksi PCR sama dengan reaksi PCR gen NS1 sebagai cetakan dari koloni bakteri hasil transformasi. Hasil PCR ditemukan produk PCR berukuran 1055 pb yang merupakan plasmid rekombinan mengandung NS1,

sedangkan plasmid tanpa gen sisipan dan kontrol negatif tidak ditemukan pita (data tidak ditunjukkan).

Selain itu, dilakukan pula reaksi PCR dengan mengganti salah satu primer dengan primer vektor AOX1 pada daerah pengenalan di luar *multiple cloning site*

plasmid. Reaksi ini membuktikan ada tidaknya gen NS1 yang berhasil tersisipi dan kebenaran arah orientasi sisipan. Hasil verifikasi PCR pada gambar 2 di lajur 2,4 dan 6 adalah plasmid rekombinan pPICD1NS1 dengan ukuram 1647 pb yang

menunjukkan bahwa gen NS1 berhasil disisipi dengan orientasi yang benar, sedangkan lajur 3,5,7,9 adalah plasmid pPICZaB berukuran 592 pb.



Gambar 2.

Verifikasi hasil pengklonaan plasmid rekombinan dengan PCR menggunakan primer vektor AOX1. Lajur 1: marker 100 pb, lajur 2,4,6: plasmid rekombinan pPICD1NS1, 1647 pb, lajur 3,5,7,9: plasmid pPICZaB, 592 pb.

Beberapa plasmid rekombinan yang sudah diidentifikasi dan diverifikasi menunjukkan adanya gen sisipan NS1 selanjutnya diverifikasi lagi menggunakan sekuensing untuk mengetahui runutan nukleotida. Sekuensing plasmid rekombinan dilakukan menggunakan primer vektor AOX1 dan primer spesifik NS1. Hasil amplifikasi dengan PCR dan sekuensing NS1 DENV-1 strain Indonesia (915846) terletak pada nukleotida 2409 sampai 3464 dari genome DENV-1, berukuran 1055 nukleotida. Fragmen gen NS1 *full length* juga telah terinsersi di vektor ekspresi pPICZaB untuk menghasilkan plasmid rekombinan pPICD1NS1. Setelah dibandingkan menggunakan software Bio Edit, sekuen nukleotida gen NS1 DENV-1 dari plasmid rekombinan sama dengan (homologi 100%) gen NS1 dari isolat aslinya DENV-1 strain Indonesia (915846). Hasil sekuensing tidak ada satupun basa yang mengalami mutasi, hal ini menunjukkan

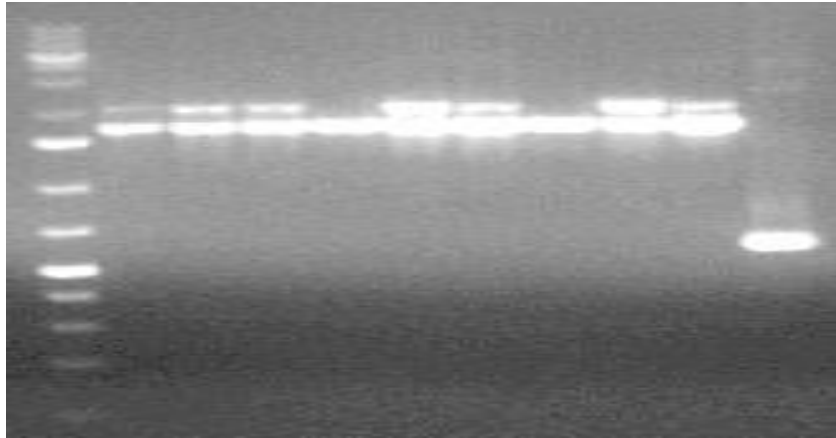
bahwa proses kloning berhasil sesuai dengan yang diharapkan. Selain itu juga diperoleh hasil bahwa DENV-1 strain Indonesia (915846) adalah genotipe IV yang merupakan salah satu strain paling umum mewakili Indonesia.

Transformasi plasmid rekombinan ke *Pichia pastoris* dan penentuan fenotif Mut

Koloni resisten Zeocin hasil transformasi dengan elektroporasi ke *P. pastoris* strain GS 115 menghasilkan pichia rekombinan. Fenotif Mut+ ditentukan dengan koloni yang dapat tumbuh normal di media MMH dan MDH. Integran multicopi diseleksi dari koloni fenotif Mut+ yang tumbuh pada konsentrasi zeocin yang ditingkatkan (500 µl/ml) pada agar YPDS. Hasil verifikasi PCR dengan pasangan primer spesifik NS1 DENV-1 diperoleh fragmen DNA dengan ukuran sekitar 1,1 kb (data tidak ditunjukkan). Hasil verifikasi PCR dengan

pasangan primer vektor AOX1 menunjukkan fragmen DNA berukuran 1,7 kb yang telah terintegrasi pada lokus AOX di kromosom sel *P. pastoris* (Gambar 3). Pada transforman Mut⁺, hasil PCR akan

terlihat ada 2 pita yaitu yang berukuran 2,2 kb adalah gen AOX sedangkan yang berukuran 1,7 kb adalah gen NS1 DENV-1 (dapat dilihat pada lajur 2-4, 6-7 dan 9-10)



Gambar 3.

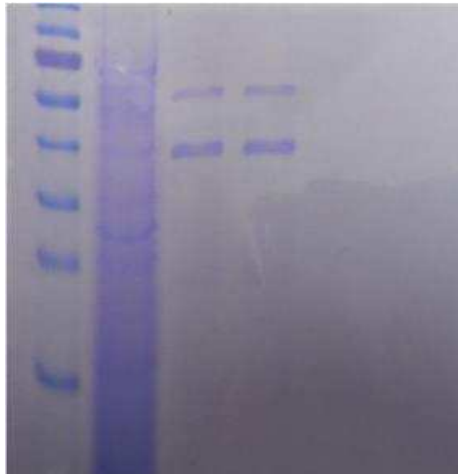
verifikasi transformant Pichia rekombinan dengan PCR menggunakan pasangan primer AOX1. Lajur 1: Marker, lajur 2,3,4,6,7,9,10: Integran pichia rekombinan GSD1NS1 Mut⁺ dengan 2 pita berukuran 1647 kb dan gen AOX1 berukuran sekitar 2,2 kb, lajur 5 dan 8: Integran pichia rekombinan GSD1NS1 Mut⁻ berukuran 1647 bp, lajur 11: kontrol plasmid tanpa gen NS1 berukuran 592 pb.

Hasil ekspresi dan purifikasi protein rekombinan rNS1 DENV-1 strain Bekasi 2003915846

Hasil identifikasi dan verifikasi yang menunjukkan kebenaran orientasi gen sisipan NS1, serta hasil seleksi fenotip Mut⁺ di media dengan konsentrasi zeocin tinggi dilanjutkan dengan proses ekspresi protein. Transforman yang sudah diverifikasi, diinduksi dengan metanol untuk mengekspresikan protein NS1 dalam pengujian skala kecil ke medium kultur. Protein terekspresi dalam supernatan dideteksi dengan SDS-PAGE 12%. Sebuah pita protein spesifik 45 kDa dideteksi pada gel. Ekspresi protein rekombinan NS1 dilakukan dalam sistem ekspresi *Pichia pastoris* strain GS115 fenotip Mut⁺ dan telah diperoleh hasil yang optimum dengan induksi methanol 1%. Sekresi ekspresi protein rNS1 diperoleh terbanyak dari transforman koloni nomer 54. Klon nomer

54 disekresi untuk menaikkan produksinya sehingga dihasilkan ekspresi yang persisten. Analisis SDS-PAGE menunjukkan jumlah yang besar protein rekombinan rNS1 dalam supernatan klon nomer 54. Hasil SDS-PAGE juga menunjukkan beberapa pita protein yang tidak spesifik (data tidak ditunjukkan), setelah dilakukan western blot hanya ada 1 pita spesifik sesuai berat molekul yang diharapkan (45 kDa).

Hasil purifikasi protein rekombinan NS1 yang telah dioptimasi menggunakan metode ultrafiltrasi dan afinitas kromatografi menggunakan kolom MCAC dan perkiraan kuantitatif menunjukkan bahwa sekresi maksimum protein rekombinan adalah 4,5 mg dalam 1 liter supernatan, diperoleh setelah 72 jam induksi dengan methanol 1% (Gambar 4).

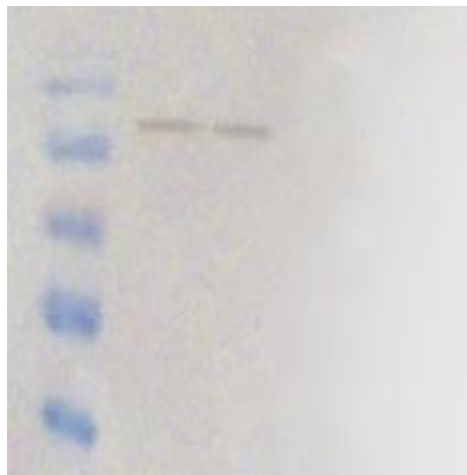


Gambar 4. Protein rekombinan NS1 purifikasi yang dideteksi dengan SDS-PAGE 12%. M: marker berat molekul protein. Lajur 1: supernatan hasil ekspresi protein rekombinan NS1 di Pichia sebelum purifikasi. Lajur 2 dan 3: hasil purifikasi protein rekombinan NS1 dengan ukuran 45 kDa.

Hasil uji antigenisitas protein rekombinan rNS1 DENV-1 strain Bekasi 2003915846 dengan metode ELISA dan Western Blot.

Hasil pemeriksaan ELISA dengan kit Platelia Dengue ELISA NS1 Antigen menunjukkan bahwa protein rekombinan

NS1 DENV-1 dapat berfungsi sebagai antigen sesuai dengan *wild type*-nya. Hasil Western Blot protein rekombinan NS1 menggunakan serum pasien terinfeksi DEN-1 sebagai antibodi menunjukkan respons antigen yang dapat dideteksi dengan berat molekul 45 kDa (Gambar 5).



Gambar 5.
Hasil western blot protein rekombinan NS1 menggunakan serum pasien terinfeksi DEN-1 sebagai antibodi. M: marker berat molekul protein. Lajur 1 dan 2 protein rekombinan NS1, lajur 3 dan 4 kontrol negatif Pichia dan PBS.

Diskusi

Penyakit dengue disebabkan oleh empat DENV yang secara genetik dan serologi berbeda (DENV 1-4) yang bersirkulasi secara endemis di beberapa daerah dan menyebabkan pola epidemiologi yang kompleks. Di Indonesia, beredar ke 4 serotipe virus dengue dengan genotipe yang bermacam-macam sehingga jika akan mengembangkan vaksin maupun kit diagnostik maka perlu menggunakan *strain* lokal yang dapat mewakili secara umum di Indonesia. DENV-1 yang bersirkulasi di Indonesia adalah genotipe I dan IV.²¹ DENV-1 *strain* Bekasi 2003915869 kandidat vaksin, masuk dalam genotipe IV, sehingga mewakili salah satu *strain* Indonesia. Infeksi oleh salah satu serotipe virus memberikan proteksi terhadap serotipe tersebut tetapi tidak pada serotipe lainnya. Infeksi sekunder atau tertier dengan serotipe yang berbeda dihubungkan dengan bertambah beratnya penyakit yang merupakan pengembangan teori peningkatan infeksi oleh sistem imun (*antibody dependent enhancement/ADE*).²²

Protein non struktural 1 (NS1) berpotensi untuk pengembangan vaksin karena tidak tergabung dalam struktur virion sebagai pengganti protein struktural untuk menghindari peningkatan respons imun yang melibatkan antibodi dari protein E yang menjadi perantara ADE. Selain itu anti NS1 yang terbentuk dapat mengaktifkan komplemen untuk melisis sel yang terinfeksi DENV. Protein NS1 juga memicu respons imun seluler sel T CD4 dan CD8 dengan memproduksi IFN- γ , TNF- α , TNF- β dan kemokin termasuk makrofag pada interaksi antigen yang mempresentasikan sel terinfeksi DENV untuk melisis sel terinfeksi. Namun antibodi yang dihasilkan oleh protein NS1 tidak dapat mencegah virus menginfeksi sel, karena protein NS1 lebih berperan pada imunitas seluler, sehingga diharapkan antibodi tersebut

dapat melisis sel yang terinfeksi virus dan akan mengurangi jumlah virus serta mencegah keparahan penyakit. Protein NS1 juga memiliki banyak epitop sel B dan sel T yang dapat dijadikan sebagai target untuk pengembangan kit diagnostik.^{8,11, 23}

Pada studi ini digunakan sistem ekspresi *Pichia pastoris* (*methylophilic yeast*) yang memiliki keuntungan kombinasi dari sistem ekspresi prokariotik (level ekspresi yang tinggi, mudah untuk menaikkan skala produksi, media pertumbuhan yang tidak mahal) dan eukariotik (kapasitas membawa modifikasi post translasi seperti glikosilasi, formasi ikatan disulfida dan proses proteolitik). Selain itu, *P. pastoris* adalah organisme yang tidak patogen, sehingga protein rekombinan yang diekspresikan di dalamnya bebas dari pirogen, toksin dan komponen virus, sehingga aman untuk penggunaan di manusia.¹⁸

Plasmid yang digunakan pada penelitian ini adalah plasmid pPICZ α B. Plasmid pPICZ α B yang aslinya dirancang dan dikonstruksikan dengan sebuah sinyal peptida, *multicloning site* dan sekuen terminal transkripsi dari gen polihistidin sehingga berguna untuk ekspresi eukariotik dari gen asing. Sinyal peptida diinkorporasi untuk fasilitas sekresi dan *poly(His)-tag* untuk proses purifikasi dan deteksi fusi protein NS1. Elektroporasi digunakan untuk meningkatkan efisiensi proses memasukkan plasmid rekombinan ke dalam sel *yeast*. Seleksi fenotip Mut⁺ dari transforman sangat penting dilakukan untuk memilih transforman dengan level ekspresi yang lebih tinggi. Protein yang dipilih untuk diekspresikan pada penelitian ini adalah protein NS1.

Pada penelitian ini telah dihasilkan konstruksi plasmid rekombinan NS1 DENV-1 dan protein rekombinan NS1 dengan berat molekul 45 kDa dengan level produksi hingga 4,5 mg dalam 1 liter supernatan, yang telah diverifikasi dengan isolasi DNA, digesti, PCR dengan primer

NS1 dan primer AOX, dengan sekuensing. Pada Hasil sekuensing menunjukkan kebenaran orientasi sesuai dengan wild type NS1 DENV-1 genotipe 4 strain Indonesia (915869) dan tidak ada satupun basa yang mengalami mutasi. Pada jel SDS PAGE masih terdapat 1 pita lain selain pita protein target, sehingga masih membutuhkan proses pemurnian lebih lanjut yaitu dengan menurunkan pH pencucian sebelum fase elusi diantaranya pH 6 – pH 4, atau juga melakukan elusi menggunakan imidazole dengan beberapa konsentrasi. Hasil pemeriksaan protein rekombinan rNS1 dengan menggunakan kit ELISA NS1 Dengue Platelia adalah positif tinggi dengan rerata 11,08 dan standar deviasi 0,4. Hasil Western Blot menggunakan serum pasien terinfeksi DENV-1 sebagai antibodi juga menunjukkan respons antigen yang dapat dideteksi dengan berat molekul 45 kDa. Hasil ini menunjukkan bahwa protein rekombinan rNS1 yang dihasilkan memiliki antigenisitas sesuai dengan *wild type*-nya. Protein NS1 DENV telah dilaporkan berhasil diekspresi pada sistem mamalia dan baculovirus namun kurang sesuai untuk ekspresi skala besar karena hasilnya sedikit.¹¹ Produksi protein rekombinan rNS1 DENV-1 strain Indonesia (915869) di sistem ekspresi tersekresi *Pichia pastoris* menunjukkan hasil yang relatif tinggi dan cukup stabil. Proses produksi dapat dilakukan dengan sistem halal menggunakan seluruh reagensia yang bebas *porcine*. Sehingga sistem ekspresi protein di *P. pastoris* ini dapat diaplikasikan juga untuk proses pengembangan vaksin dengan antigen lain, khususnya bagi negara yang sangat memperhatikan isu halal termasuk Indonesia.

Kesimpulan

Hasil penelitian menunjukkan bahwa protein rekombinan NS1 DENV-1 strain Indonesia (915846) dapat diproduksi secara tersekresi di sistem *methylootropic yeast Pichia pastoris*. Level ekspresi

tersekresi yang cukup tinggi dari protein rekombinan rNS1 DENV-1 strain Indoneisa (915869) telah diperoleh di *P. pastoris* dengan induksi methanol 1%. Proses produksi dengan sistem tersekresi di *Pichia pastoris* ini memudahkan purifikasi. Protein rekombinan yang dihasilkan memiliki antigenisitas dan berat molekul yang mirip dengan protein virus dengue *wild type* nya. Produksi protein rekombinan rNS1 DENV-1 strain Indoneisa (915869) yang efisien dan fungsional di sistem ekspresi tersekresi *P. pastoris* merupakan sistem yang halal dan berpotensi digunakan untuk penelitian pengembangan kandidat vaksin dan kit diagnostik.

Saran

Perlu dilakukan penelitian lanjutan menilai karakterisasi imunogenisitas protein rekombinan NS1 DENV-1 strain Indonesia (915846) untuk mengetahui reaksi silang terhadap ke empat serotipe dengue. Jika ternyata dapat memberikan reaksi silang terhadap ke empat serotipe dengue, maka hanya diperlukan satu serotipe protein NS1 saja untuk pengembangan selanjutnya.

Ucapan terima kasih

Terima kasih kami sampaikan kepada Badan Litbangkes, Kemenkes yang telah mendanai penelitian ini dan kepala Pusat Biomedis dan Teknologi Dasar Kesehatan yang memfasilitasi penelitian di laboratorium imunologi PBTDK. Kami juga menyampaikan terima kasih kepada Dr. Agung Eru Wibowo, M.Si., Apt sebagai Kepala Laboratorium Teknologi Farmasi dan Medika, BPPT Serpong yang telah memfasilitasi sebagian kegiatan eksperimental di laboratorium serta rekan-rekan yang turut membantu yaitu Siti Mariany Saragih AMAK, Dodi Irawan S.Si, Wahyu Hidayati S.Si M. Biomed dan Aris S.Si.

Daftar Rujukan

1. World Health Organization (WHO). Dengue Guideline for Diagnosis, Treatment, Prevention and Control. New edition. Switzerland: WHO Press, 2009.
2. Gubler DJ. Dengue and Dengue Haemorrhagic Fever. *Clinical Microbiology Review* 1998; 11(3): 480-96.
3. World Health Organization (WHO). Global Strategy for Dengue Prevention and Control (2012-2020). Switzerland: WHO Press, 2012.
4. World Health Organization (WHO). Situation update of dengue in the SEA Region. Switzerland: WHO Press, 2010.
5. WHO-SEARO. Comprehensive guidelines for prevention and control of dengue and dengue haemorrhagic fever, (Revised and expanded. Ed). New Delhi, India: World Health Organization, 2011
6. World Health Organization (WHO). Dengue and severe dengue. 2012. http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs_117/en/. Diakses pada tanggal 15 Desember 2014.
7. Kementerian Kesehatan. Rencana Strategis Kementerian Kesehatan tahun 2010-2014, Keputusan Menkes RI, nomer HK 03.01/160/1/2010. Jakarta: Kementerian Kesehatan, 2010.
8. Wu SF, Liao CL, Lin YL, Yeh CT, Chen LK, Huang YF, Chou HY, Huang JL, Shaio MN, Sytwu HK. Evaluation of protective efficacy and immune mechanisms of using a non-structural protein NS1 in DNA vaccine against dengue 2 virus in mice. *Vaccine* 2003; 21: 3919-29.
9. Flamand M, Megret F, Mathieu M, Lepault J, Rey FA, Deubel V. Dengue virus type 1 nonstructural glycoprotein NS1 is secreted from mammalian cells as a soluble hexamer in a glycosylation-dependent fashion. *J Virol* 1999; 73(7): 6104-6110.
10. Wang X, Huang X, Wang S. Study on immunity of dengue virus and dengue vaccine development. *Front Biol China* 2009; 4(2): 125-128.
11. Zhou JM, Tang YX, Fang DY, Zhou JJ, Liang Y, Guo HY, Jiang LF. Secreted expression and purification of dengue 2 virus full-length non-structural glycoprotein NS1 in *Pichia pastoris*. *Virus Genes* 2006; 33: 27-32
12. Chuang YC, Wang SY, Lin YS, Chen HR, Yeh TM. Re-evaluation of the pathogenic roles of nonstructural protein 1 and its antibodies during dengue virus infection. *J Biomed Sci* 2013; 20(42): 1-7.
13. Khan AM, Miottob O, Heinyb AT, Salmond J, Srinivasand KN, Nascimentod E, Marquesd ET, Brusica V, Tanb TW, Augustd TJ. A systematic bioinformatics approach for selection of epitopebased vaccine targets. *Cell Immunol* 2006; 244(2): 141-47.
14. Falconar AKI. Antibody responses are generated to immunodominant ELK/KLE-Type motifs on the nonstructural-glycoprotein during live dengue virus infections in mice and human: implications for diagnosis, pathogenesis, and vaccine design. *Clin Vaccine Immunol* 2007; 14(5): 493-504.
15. Falconar AKI. Monoclonal antibodies that bind to common epitopes on the dengue virus type 2 nonstructural-1 and envelope glycoproteins display weak neutralizing activity and differentiated responses to virulent strains: implications for pathogenesis and vaccines. *Clin Vaccine Immunol* 2008; 15(3): 549-61.
16. Falconar AKI, Young PR, Miles MA. Precise location of sequential dengue virus subcomplex and complex B cell epitopes on the nonstructural-1 glycoprotein. *Arch Virol* 1994; 137: 315-26.
17. Wu HC, Huang YL, Chao TT, Jan JT, Huang JL, Chiang HY, King CC, Shaio MF. Identification of B-Cell Epitope of Dengue Virus Type 1 and Its Application in Diagnosis of Patients. *J Clin Microbiol* 2001; 39(3): 977-82.
18. Yao ZJ, Kao MCC, Loh KC, Chung MCM. A serotype-specific epitope of dengue virus 1 identified by phage displayed random peptide library. *FEMS Microbiology Letters* 1995; 127(1-2): 93-8.
19. Chaturvedi UC, Shrivastava R, Nagar R. Dengue vaccines: Problems & prospects. *Indian J Med Res* 2005; 121: 639-52
20. Costa SM, Freire MS, Alves AMB. DNA vaccine against the non-structural 1 protein (NS1) of Dengue 2 virus. *Vaccine* 2006; 24: 4562-64.
21. Mulyatno KC, Yamanaka A, Yotopranoto S, Konishi E. Vertical transmission of dengue virus in *Aedes aegypti* collected in Surabaya, Indonesia, during 2008-2011. *Jpn J Infect Dis* 2012; 65(3): 274-6.
22. Hombach J. Vaccines against dengue: a review of current candidate vaccines at advanced development stages. *Pan Am J Public Health* 2007; 21(4): 254-60.
23. Zhang W, Chipman PR, Corver J, Johnson PR, Zhang Y, Mukhopadhyay S, Baker TS, Strauss JH, Rossmann MG, Kuhn RJ. Visualization of membrane protein domains by cryo-electron microscopy of dengue virus. *Nat Struct Biol* 2003; 10(11): 907-12.