KLONING FRAGMEN DNA PENGKODE S_{80-180} GALUR ALAMI DAN MUTAN G145R VIRUS HEPATITIS B PADA *ESCHERICHIA COLI* JM109

Tina Rostinawati, Debbie Sofie Retnoningrum

ABSTRAK

Virus hepatitis B (HBV) merupakan penyebab infeksi hepatitis kronis di dunia. Pemberian vaksin yang mengandung protein S dapat menginduksi antibodi protektif melawan semua subtipe HBV. Sebuah mutasi titik pada gen pengkode determinan "a" HBsAg yang menyebabkan substitusi glisin (G) oleh arginin (R) pada posisi 145 (mutan G145R) menurunkan kemampuan pengikatan antibodi yang diinduksi oleh antigen HBsAg galur alami dan ini merupakan salah satu contoh mutan lolos vaksin. Protein rekombinan dapat melengkapi uji imunologi yang saat ini hanya spesifik untuk HBsAg galur alami. Penelitian ini difokuskan pada gen pengkode fragmen S80-180 (merentang residue pada posisi 80 hingga 180 protein S). Tujuan penelitian adalah mengkonstruksi gen pengkode protein S80-180 galur alami dan mutan G145R pada vektor kloning pGEM-T pada *Escherichia coli* (*E. coli*) JM109. Fragmen DNA pengkode protein S80-180 galur alami dan mutan G145R diamplifikasi dengan reaksi polimerase berantai (PCR) menggunakan cetakan HBV. Produk PCR tersebut diligasikan pada vektor kloning pGEM-T dan hasil ligasi ditransformasikan ke *E. coli* JM109. Transforman diskrining dengan ampisilin dan sistem seleksi biru / putih. Plasmid dari transforman putih resisten ampisilin diisolasi dan dikarakterisasi dengan analisis migrasi, PCR, pemotongan ganda, dan penentuan urutan nukleotida DNA sisipan. Hasil analisis migrasi menunjukkan bahwa pGEM-T rekombinan bermigrasi lebih lambat dibandingkan dengan pGEM-T non rekombinan. PCR menggunakan primer T7 dan SP6 menghasilkan pita DNA yang berukuran sekitar 500 pasangan basa (pb) yang hampir sama dengan ukuran teoritis , 545 pb. . Analisis pemotongan dengan enzim BamHI dan NdeI memberikan pita DNA sisipan yang berukuran di bawah 500 pb (secara teoritis 339 pb) dan pGEM-T linier yang berukuran sekitar 3000 pb. Analisis terhadap hasil penentuan urutan

nukleotida menggunakan program BLAST (Basic Local Alignment Tool) menunjukkan bahwa DNA sisipan untuk gen pengkode S80-180 galur alami dan mutan G145R memiliki homologi 99% dengan urutan nukleotida gen S (kode akses GenBank AB113220.1 dan AB 113238.1). Hasil pensejajaran urutan nukleotida gen pengkode S80-180 galur alami dengan mutan G145R

Kata kunci : Virus hepatitis B, HBsAg, mutan lolos vaksin, G145R

ABSTRACT

CLONING OF DNA FRAGMENTS ENCODING WILDTYPE AND G145R MUTANT OF HEPATITIS B VIRUS IN JM109 ESCHERICHIA COLI

Infection of hepatitis B virus (HBV) is an important chronic viral infection worldwide, and vaccination is currently the most effective means to prevent the disease. Administration of vaccine containing S protein induces protective antibody against all subtypes of HBV. A point mutation on the gene encoding "a" determinant of HBsAg resulting in a glycine (G) to arginine (R) subsitution at position 145 (G145R mutant) reduced its capacity to bind to the wild-type HBsAg-induced antibody and this is one example of vaccine escape mutants. This research that was focused on a DNA fragment encoding for S80-180 (spanning residues 80 to 180 of S protein). The purpose of the research was to construct genes encoding wild-type and G145R mutant S80-180 in a cloning vector of pGEM-T in E. coli JM109. DNA fragment for encoding wild-type and G145R mutant S80-180 each was amplified by polymerase chain reaction (PCR) using HBV templates. PCR product was ligated into pGEM-T cloning vector and the ligated product was transformed into E. coli JM 109. The transformants were screened by ampicillin blue / white selection system. Plasmid was isolated from white ampicillin resistant and characterized by using migration, PCR, double restriction analyses and nucleotide sequencing of inserted DNA. DNA fragment encoding for wildtype and G145R mutant of S80-180 was each isolated from recombinant pGEM-T digested using BamHI and

NdeI, ligated into pET16b expression vector which was already digested by the same enzymes. The ligated product was transformed into E. coli DH5□ and BL21 and the transformants were selected using ampicillin. Recombinant pET16b was isolated from ampicillin resistant transformants and characterized using PCR and migration analysis. Result of migration analysis showed that the recombinant pGEM-T slowly migrated than that of non recombinant. PCR analysis using T7 dan SP primers produced a DNA band of about 500 base pairs (bps) that is close to its calculation size (545 bps). Restriction analysis using BamHI and NdeI produced an inserted DNA with lower than 500 bps in size (theoretical size of 339 bps) and a DNA band of linier pGEM-T of 3000 bps having the same theoretical size. Analysis to nucleotide sequences of insert DNA using BLAST program showed that DNA fragment for gene encoding wild-type and G145R mutant S80-180 have 99% homology with those of gen S (accession number of AB 113220.1 and AB113238.1 in GenBank). Result of nucleotide sequence alignment showed that there was a right mutation at the codon 145 i.e. GGA→AGA.

Key words : Hepatitis B virus, HBsAg, vaccine escape mutant, G145R

PENDAHULUAN

Infeksi virus hepatitis B (HBV) pada manusia mencapai angka yang cukup tinggi di seluruh dunia. Pada daerah dengan prevalensi tinggi seperti Afrika, Cina dan Asia tenggara (termasuk Indonesia) lebih dari setengah populasi terinfeksi, dan lebih dari 8% merupakan pembawa kronik virus tersebut. HBV ini bekerja dengan cara merusak hati secara tidak langsung melalui gangguan sistem kekebalan/imun dan selanjutnya dapat menyebabkan infeksi yang berkepanjangan seperti sirosis hati, kanker hati, dan menyebabkan kematian. Pencegahan penyakit hepatitis B merupakan cara yang paling ampuh dan vaksinasi HBV merupakan program wajib pada banyak negara. WHO sudah mengeluarkan protokol vaksinasi hepatitis B untuk

diterapkan di seluruh dunia. Saat ini HBsAg yang merupakan protein permukaan HBV telah dijadikan vaksin rekombinan komersial dan sebagai kit diagnostik terhadap infeksi HBV.

Sejak tahun 1990 banyak ditemukan HBV yang mengalami mutasi yang berlokasi diantara kodon 100-160 yang merupakan daerah Major Hydrophilic Region (MHR). Mutasi pada kodon 126,129, 130, 141, dan 144 dilaporkan telah menyebabkan perubahan antigenitas yang kecil pada protein S. Dilaporkan pula telah terjadi mutasi titik pada gen pengkode determinan "a" HBsAg yang menyebabkan substitusi asam amino glisin (G) oleh arginin (R) pada posisi 145 (varian arginin-145 atau G145R). Mutasi tersebut menimbulkan fenomena mutan lolos vaksin yaitu kejadian dimana individu yang sudah divaksinasi HBsAg ternyata masih menderita infeksi hepatitis B. Diketahui bahwa epitop yang mengandung asam amino ke 145 ini bersifat imunodominan dan perubahan pada asam amino ini akan akan menyebabkan sifat antigenitas epitop yang bertambah sehingga tidak dapat dinetralkan oleh anti-HBsAg yang telah terbentuk sebelumnya. Mutasi ini menyebabkan HBV mutan tidak lagi dikenali oleh antibodi yang sudah terbentuk pada saat imunisasi sehingga virus ini masih mampu menginfeksi orang yang telah divaksinasi (Paulij et al.,1999 dan Chiou et al.,1997). Pada penelitian lain dilaporkan pula adanya mutasi pada DNA yang menyebabkan perubahan asam amino metionin menjadi valine pada kodon 133 yang menunjukkan penurunan reaktivitas antibodi yang diinduksi oleh vaksin rekombinan HBsAg (Chen et al., 2003).

Di Asia prevalensi kejadian mutan lolos vaksin diasumsikan tinggi, mengingat penyebaran HBV di wilayah ini tinggi. Di Indonesia, telah ditemukan beberapa mutan HBV yaitu mutan G145R, M133T dan terjdi penyisipan satu basa nukleotida G, pada beberapa kota besar di pulau Jawa (Aprillia, 2004). Individu yang mengalami mutan lolos vaksin beresiko mengalami hepatitis kronis dan karsinoma hati bahkan dapat berlanjut ke kematian.

Penelitian bertujuan menghasilkan protein rekombinan S80-180 mutan G145R yang digunakan sebagai pereaksi diagnostik untuk mendeteksi keberadaan mutan lolos vaksin hanya terhadap mutan G145R. Protein rekombinan ini akan melengkapi sistem pendeteksian terhadap HBsAg galur alami yang sudah ada sehingga dapat mencegah terjadinya kegagalan pemberian immunoglobulin hepatitis B (HBIG) pada bayi yang baru lahir dari ibu yang positif HBsAg serta imunoprofilaksis pada pasien yang melakukan transplantasi hati.

Pada penelitian ini gen pengkode protein SHBsAg, ditentukan terletak antara S80-180, yang mencakup MHR pada posisi kodon 100-160. Pada MHR ini terdapat determinan "a" yang merupakan target utama netralisasi antibodi, apabila terjadi perubahan konformasi pada daerah ini yang disebabkan adanya substitusi asam amino tertentu yang dapat mengubah antigenitasnya maka antibodi anti-HBsAg galur alami tidak dapat mengenali antigen tersebut sehingga terjadi fenomena mutan lolos vaksin.

Hasil studi prediksi epitop menunjukkan adanya substitusi glisin oleh arginin pada mutan G145R telah merubah konformasi epitop dari antigen ini menjadi lebih ke arah luar permukaan. Perubahan tersebut menyebabkan sifat antigenitasnya bertambah sehingga dapat menjelaskan menurunnya kemampuan antibodi anti-HBsAg galur alami berikatan pada antigen tersebut.

Pada penelitian ini akan dikonstruksikan plasmid rekombinan menggunakan pGEM-T sebagai vektor kloning dan pET16b sebagai vektor ekspresi yang membawa gen pengkode protein S80-180 galur alami dan mutan G145R. Pada penelitian selanjutnya dilakukan overproduksi dan pemurnian protein S80-180 galur alami dan mutan G145R. Protein tersebut digunakan sebagai kit diagnostik baru untuk mendeteksi keberadaan antibodi HBsAg mutan G145R pada individu yang terinfeksi HBV. Tujuan dari penelitian ini adalah mendapatkan dua klon gen pengkode S80-180 masing-masing galur alami dan mutan G145R dikonstruksikan

dengan vektor kloning pGEM-T dan vektor ekspresi pET16b.

METODE PENELITIAN

Amplifikasi DNA Pengkode S_{80-180} Galur Alami dan Mutan G145R

Pada proses amplifikasi DNA dengan metode PCR terlebih dahulu dilakukan proses perancangan primer, penyediaan primer, dan penyiapan komponen PCR lainnya (enzim *Taq* polimerase, buffer, dNTP dan cetakan DNA) kemudian pengaturan suhu yang terdiri dari suhu denaturasi, suhu penempelan dan suhu pemanjangan.

1 Perancangan Primer

Primer dirancang berdasarkan urutan nukleotida gen pengkode S_{80-180} galur alami yang terdapat pada NCBI dengan nomer akses AY603466. Primer dirancang menggunakan program *DNASTAR*^{TM}. Pada primer *forward* ditambahakan situs pengenalan untuk enzim restriksi *Nde*I (5'-CATATG-3') dan enzim restriksi *BamH*I (5'-GGATCC-3') pada primer *reverse*. Urutan DNA yang dikenali kedua enzim diatas terdapat pada situs restriksi vektor ekspresi pET 16b yang penting untuk penyisipan gen pengkode S_{80-180}WT.

2 Reaksi Polimerase Berantai

Komponen reaksi PCR sejumlah 50 μL dibuat dengan mereaksikan 5 μL larutan dapar *Taq*, 1 μl dNTP 20 mM, 0,25 μl *Taq* polimerase 5 U/μL, 2 μL primer *reverse* (RBB) 25 mM, 2 μL primer *forward* (FB) 25 mM dan 5 μL $MgCl_2$ 25mM. Kemudian pereaksi tersebut dicampurkan dengan 10 μL cetakan plasmid dan digenapkan dengan air suling ganda steril sampai 50 μL. Kondisi PCR adalah sebagai berikut: denaturasi awal pada 94°C selama 5 menit; reaksi dilakukan sebanyak 35 siklus, setiap siklus terdiri dari denaturasi pada 94°C selama 2 menit, penempelan pada 47°C selama 2 menit, dan pemanjangan fragmen DNA oleh *Taq* polimerase pada 72°C selama 2 menit; pemanjangan fragmen DNA akhir pada 72°C selama 10 menit. Produk PCR selanjutnya dielektroforesis pada gel agarosa 1 % b/v dalam dapar *Tris Acetat EDTA* (TAE), pada tegangan 90 Volt, kekuatan arus 400 mA, selama 45 menit. Sebagai marka DNA digunakan marka puC/*Hindf*I.

Pemurniaan Produk PCR Menggunakan Kolom GFX

Pemurniaan produk PCR menggunakan kolom GFX bertujuan agar mendapatkan fragmen DNA murni yang akan diligasikan dengan vektor kloning. Produk PCR hasil elektroforesis pada gel dipotong lalu ditimbang ditambahkan sejumlah dapar penjerat yang banyaknya sebanding dengan berat gel. Inkubasi pada suhu ruang 60^0 C sampai agar mencair kemudian disentrifuga pada 13000 putaran per menit selama 1 menit dipindahkan ke dalam kolom GFX, disentrifuga kembali pada 13000 putaran per menit selama 1 menit. Cairan pada tabung pengumpul dibuang dan ke dalam kolom ditambahkan 500 µL dapar pencuci. Kolom disentrifuga pada 13000 putaran per menit selama 1 menit dan cairan pada tabung pengumpul dibuang. Kolom kemudian dipindahkan ke tabung mikrosentrifuga 1,5 ml dan matriks pada kolom GFX dielusi dengan 50 µL aquabidestilata steril, diinkubasi pada suhu ruang selama 1 sampai 5 menit, disentrifuga pada 13000 putaran per menit selama 1 menit, didapat cairan DNA pekat dalam tabung mikrosentrifuga 1,5 mL.

Ligasi DNA Pengkode $S_{80\text{-}180}$ ke Vektor Kloning pGEM-T

Perhitungan jumlah gen pengkode $S_{80\text{-}180}$ yang akan diligasi ke pGEMT sebagai berikut,

$$\text{Jumlah DNA sisipan} = \frac{\text{Jumlah vektor x ukuran DNA sisipan}}{\text{Ukuran vektor}}$$

dimana A, rasio DNA sisipan : vektor adalah perbandingan DNA sisipan dan vektor yang optimum untuk proses ligasi. Sebanyak x ng DNA sisipan, 50 ng vektor pGEMT, 1µL T4 DNA ligase (3 unit/µL), dan 1,5 µL dapar ligase 10x dicampur. Volume akhir reaksi adalah 15 µL. Ligasi dilakukan pada suhu 4° C selama 24 jam.

Transformasi ke *Escherichia coli* JM109

Transformasi bertujuan untuk memasukkan hasil ligasi fragmen DNA dengan vektor kloning ke dalam sel *E. coli* JM 109. Pada proses transformasi disiapkan terlebih dahulu sel kompeten, merupakan sel yang disiapkan untuk menerima hasil ligasi.

1. Pembuatan Sel Kompeten

E. coli JM109 dikultur pada media *luria bertani* (LB) padat dan diinkubasi pada 37°C selama 24 jam. Koloni tunggal *E. coli* JM109 disuspensikan ke dalam 5 mL LB cair dan diinkubasi pada 37°C, 150 putaran per menit selama 24 jam. Sebanyak 0,5 mL kultur dimasukkan ke dalam 10 mL LB cair dan diinkubasi 37°C, 150 putaran per menit, sampai didapat kerapatan optik$(OD)_{600}$ 0,3-0,4. Kultur dipindahkan ke dalam tabung mikrosentrifuga 1,5 mL yang sebelumnya telah didinginkan di dalam es, sentrifuga pada 7500 putaran per menit selama 5 menit. Pellet dicuci dengan 500 µL kalsium klorida ($CaCl_2$) 0,1 M dingin dan steril, sentrifuga pada 7500 putaran per menit selama 5 menit. Pellet diresuspensikan dalam 50 µL $CaCl_2$ 0,1 M dingin dan steril. Campuran diinkubasikan dalam es selama 2 jam.

2. Transformasi ke *Escherichia coli* JM109

Sebanyak 10 µL produk ligasi dimasukkan ke dalam 50 µL sel kompeten. Sebagai kontrol positif digunakan pGEM-T tanpa DNA sisipan (plasmid sirkular) dan sel kompeten tanpa plasmid sebagai kontrol negatif. Ketiga campuran diinkubasi dalam es selama 1 jam. Proses *heat shock* dilakukan pada suhu 42° selama 90 detik, setelah itu diinkubasi dalam es selama 2 sampai 5 menit, kemudian ditambahkan media LB cair sebanyak 450 µL. Inkubasi dilakukan pada suhu 37°C, 150 putaran per menit, selama 2 jam.

Produk ligasi sejumlah 500 µL dipekatkan menjadi 50 µL kemudian disebarkan pada 15 mL media LB padat yang mengandung 0,1mg/ml ampisilin, 0,8 mg X-gal dan 0,397 mM IPTG. Sebanyak 150 µL kontrol positif dan 150 µL kontrol negatif masing-masing disebarkan pada 15 mL media Luria-Bertani (LB) padat yang mengandung 0,1 mg/ml ampisilin. Produk ligasi, kontrol positif, dan kontrol negatif kemudian diinkubasi pada 37° selama 24 jam.

Karakterisasi pGEM-T $S_{80\text{-}180}$ Galur Alami dan Mutan G145R

Plasmid rekombinan dari hasil transforman diisolasi kemudian karakterisasi meliputi

analisis migrasi, PCR, restriksi dan penentuan urutan nukleotida DNA sisipan.

1. Analisis Migrasi pGEM-TS$_{80-180}$ Galur Alami dan Mutan G145R

Plasmid rekombinan dimurnikan dengan kit *Qiapreps* dari Qiagen. Biakan 24 jam *E.coli* JM109 koloni putih dalam 10 mL media LB cair yang mengandung 0,1 mg/mL ampisilin disentrifuga pada 13000 putaran per selama 1 menit. Pellet dicuci dengan 500 µL *saline tris EDTA* (STE) steril dan disentrifuga pada 13000 putaran per menit selama 1 menit. Pellet disuspensikan dalam 250 µL dapar P1. Ke dalam suspensi sel ditambahkan 250 µL dapar P2 (dapar lisis) dan dihomogenkan secara hati-hati, diinkubasi pada suhu ruang selama tidak lebih dari 5 menit. Kedalam campuran ditambahkan 450 µL dapar N3 (dapar netralisasi), homogenkan secara hati-hati dan sentrifuga pada 13000 putaran per menit selama 10 menit. Supernatan dimasukkan ke dalam kolom *Qiaprep* dan disentrifuga pada 13000 putaran per menit selama 1 menit. Cairan pada tabung pengumpul dibuang dan ke dalam kolom ditambahkan 500 µL dapar PB. Kolom disentrifuga pada 13000 putaran per menit selama 1 menit. Cairan pada tabung pengumpul dibuang dan ke dalam kolom ditambahkan 750 µL dapar PE (dapar pencuci). Kolom disentrifuga 13000 putaran per menit selama 1 menit. Cairan pada tabung pengumpul dibuang dan kolom disentrifuga kembali pada 13000 putaran per menit selama 1 menit. Cairan pada tabung dibuang dan kolom dipindahkan ke tabung mikrosentrifuga 1,5 mL steril. Kolom dielusi 2 kali dengan 30 µL aquabidestilata steril dan disentrifuga pada 13000 putaran per selama 1 menit. Hasil isolasi plasmid kemudian dielektroforesis pada gel agarosa 1% b/v dalam dapar TAE 1x, pada teganagan 90 Volt, kekuatan arus 400 mA selama 45 menit.

2. Analisis PCR pGEM-T S$_{80-180}$ Galur Alami dan Mutan G145R

Analisis PCR plasmid rekombinan yeng menggunakan primer T7 dan SP6 bertujuan untuk mengetahui adanya DNA sisipan pada plasmid pGEMT. Plasmid rekombinan diPCR menggunakan primer

T7 dan SP6 dengan kondisi PCR untuk primer tersebut.

3. Analisis Restriksi pGEM-TS$_{80-180}$ Galur Alami dan Mutan G145R

Analisis restriksi dilakukan secara ganda dengan *BamH*I dan *Nde*I. Hasil restriksi dielektroforesis pada gel agarosa 0,8% b/v dalam dapar TAE 1x, pada tegangan 90 Volt, kekuatan arus 400 mA selama 45 menit. Hasil restriksi dielektroforesis pada gel agarosa, terlihat adanya pita DNA sisipan yang ukurannya dibawah 500 pb dibandingkan dengan marka dan pita DNA plasmid linier.

4. Analisis Urutan Nukleotida Gen Pengkode S$_{80-180}$ Galur Alami dan Mutan G145R

Analisis urutan nukleotida gen pengkode S$_{80-180}$ galur alami dan mutan G145R dilakukan untuk mengkonfirmasi lebih lanjut kebenaran urutan nukleotida DNA sisipan. Gen sisipan ditentukan urutan DNA-nya menggunakan *sequencer* DNA otomatis dengan menggunakan primer T7 dan SP6. Hasil urutan nukleotida gen pengkode S$_{80-180}$ galur alami dan mutan G145R yang didapatkan di*Blast* (*Basic Local Alignment Search Tool*) terhadap data Gen Bank.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Amplifikasi DNA Pengkode S$_{80-180}$ Galur Alami dan Mutan G145R

Perancangan primer bertujuan agar primer dapat secara tepat berkomplemen pada cetakan DNA. Hasil perancangan primer *forward* FB dan *reverse* RBB dapat dilihat pada Gambar 1.

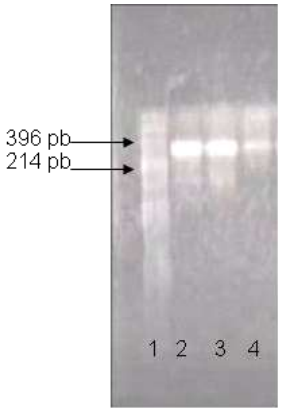
S80180FB 5’-catatgctgcggcgttttatcat-3’
(primer *forward)*

S80180RBB 5’-ggatccttaaagccctgcgaacca-3’
(primer *reverse*)

Gambar 1 **:** Hasil perancangan primer FB dan
RBB menggunakan program *DNASTAR*^{TM}

Primer *forward* dan *reverse* tersebut digunakan untuk reaksi polimerase berantai bertujuan untuk memperbanyak gen pengkode S$_{80-180}$ galur alami dan

mutan G145R. Hasil produk PCR dapat maksimal dengan mengoptimasi komponen reaksi dan kondisi PCR. Hasil elektroforesis menunjukkan PCR fragmen DNA menghasilkan pita DNA yang berukuran antara 214 - 396 pb, dapat dilihat pada Gambar 2.



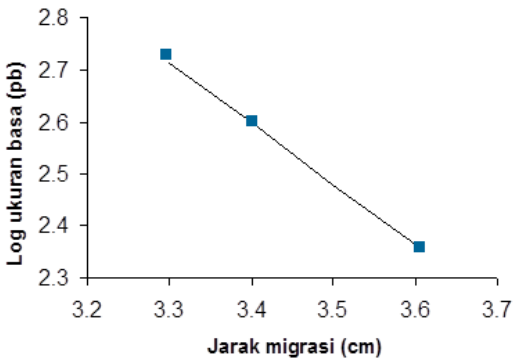
Gambar 2: Hasil PCR DNA pengkode S_{80-180} menggunakan primer FB & RBB. 1) marka pUC/*Hinf* I. 2) cetakan HBV dengan kode 2320. 3) DNA pengkode S_{80-180} galur alami. 4) DNA pengkode S_{80-180} G145R

DNA pengkode S_{80-180} galur alami dan mutan G145R masing-masing berhasil diamplifikasi menggunakan primer *forward* FB dan *reverse* RBB. Hal ini ditunjukkan dengan adanya pita yang berukuran diantara 214 dan 396 pb (ukuran teoritis hasil PCR 345 pb) dengan menggunakan marka pUC/*Hind*I serta analisa menggunakan kurva hubungan jarak migrasi dengan logaritma ukuran marker DNA pUC 19/ *Hindf* I dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1 : Penentuan Ukuran Produk PCR Gen Pengkode S80-180 Galur Alami

urutan marker*	Pasangan basa (pb)	Logaritma pasangan basa	Jarak migrasi (cm)
1	517	2,713	3,3
2	396	2,598	3,4
3	214	2,330	3,6

*sesuai urutan marka DNA pada elektroforegram



Gambar 3 : Kurva hubungan antara jarak migrasi dengan logaritma ukuran *marker* DNA pUC/*Hinf*I

digunakan untuk menentukan ukuran produk PCR gen pengkode S_{80-180}. Persamaan regresi linier

$y = -1{,}2857x + 6{,}9613$, $r^2 = 0{,}9987$

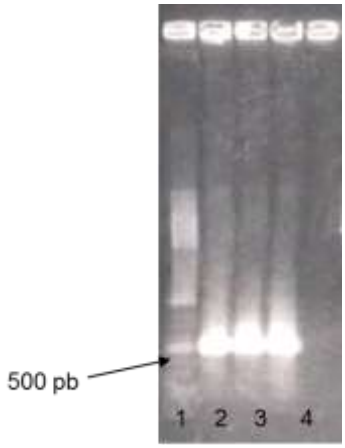
Klon pGEM-T rekombinan S_{80-180} galur alami dan mutan G145R

Klon pGEM-T rekombinan telah diperoleh dari seleksi transforman biru dan putih. Plasmid rekombinan diisolasi menggunakan kit Qiagen dan dikarakterisasi untuk memastikan adanya DNA sisipan pada plasmid. Jarak migrasi plasmid pGEM-T S_{80-180} galur alami dan mutan G145R lebih pendek dibandingkan dengan pGEM-T tanpa DNA sisipan. Plasmid rekombinan mengandung DNA sisipan sehingga laju migrasinya lebih lambat dibanding dengan plasmid non rekombinan dapat dilihat pada Gambar 4.

Gambar 4:Analisis migrasi plasmid rekombinan dan non rekombinan. 1) plasmid pGEM-T S_{80-180} galur alami.. 2) plasmid pGEM-T S_{80-180} G145R. 3) plasmid pGEM-T S_{80-180} G145R

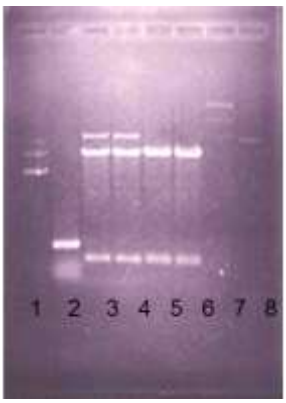
Hasil karakterisasi dengan PCR menggunakan primer T7 (primer menempel pada promoter T7 pGEM-T dengan urutan nukleotida 5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3') dan Sp6 (primer menempel pada promoter SP6 pGEM-T dengan urutan nukleotida 5'-ATTTAGGTGACACTATAGAAT-3)' menunjukkan adanya pita yang berukuran sekitar 500 pb (yang terletak disekitar marka 500 pb). Hal ini berarti adanya DNA sisipan pada plasmid karena gen yang teramplifikasi adalah DNA sisipan yang berukuran 345 pb ditambah dengan sebagian basa nukleotida pada plasmid pGEM-T yang dibatasi oleh primer T7 dan

Sp6 berkisar 200 pb sehingga jumlahnya sekitar 500 pb dapat dilihat pada Gambar 5.



Gambar 5 : Hasil PCR plasmid menggunakan primeT7 & SP6. 1. marka 100 pb *ladder*. 2) pGEM-T S_{80-180} WT. 3) pGEM-T S_{80-180} G145R. 4) pGEM-T S_{80-180} G145R

Selanjutnya analisis restriksi menggunakan enzim restriksi *BamH*I dan *Nde*I menunjukkan adanya DNA sisipan yang keluar dari plasmid yang ditunjukkan dengan ukuran pita DNA dibawah ukuran 500 pb (ukuran teoritis 339 pb) dengan menggunakan marka pembanding hasil PCR insert menggunkan primer T7 dan Sp6 dapat dilihat pada Gambar 6.



Gambar 6 : Hasil analisis restriksi pGEM-T S_{80-180} galur alami dan G145R dengan *Nde*I dan *BamH*I. 1) pGEM-T S_{80-180}G145R sebagai pembandin 2) marka 500 pb 3) pGEM-T S_{80-180} G145R dipotong dengan enzim*Nde*I dan *BamH*I 4) pGEM-T S_{80-180}G145R dipotong dengan enzim *Nde*I dan *BamH*I

Karakterisasi Penentuan Urutan Nukleotida DNA Sisipan

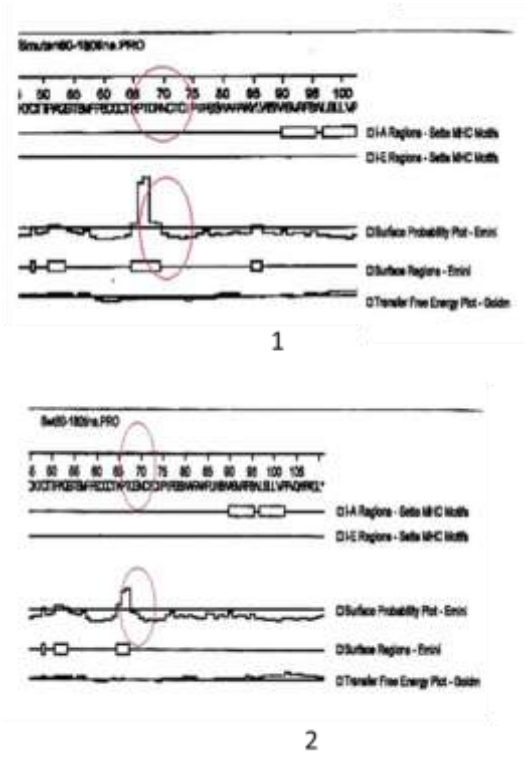
Pada plasmid rekombinan dilakukan karakterisasi penentuan urutan nukleotida DNA sisipan. Hasil penentuan urutan nukleotida DNA sisipan dianalisis dengan membandingkan urutan nukleotida gen S yang dideposit di Gen Bank menggunakan program BLAST di situs www.ncbi.nlm.nih.gov. Hasil analisis BLAST menunjukkan bahwa DNA sisipan untuk gen pengkode S_{80-180} galur alami memilki homologi 99% dengan urutan

nukleotida gen S yang memiliki kode akses AB113220.1 di Gen Bank (Gambar 7).

Gambar 7 ; Hasil analisis BLAST penentuan urutan nukleotida gen pengkode protein S_{80-180} galur alami

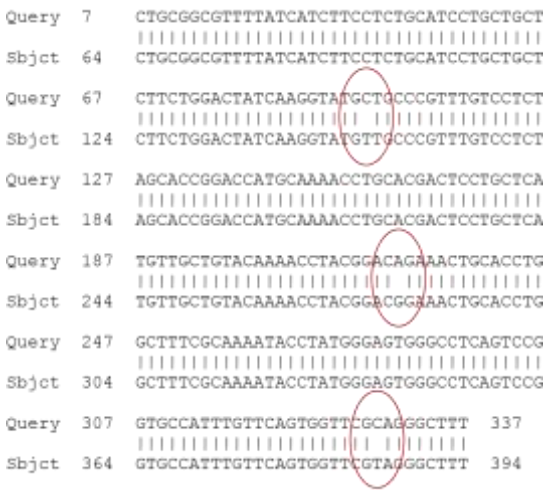
Berdasarkan hasil analisis BLAST antara urutan nukleotida DNA sisipan (gen pengkode S $_{80-180}$ galur alami) dengan urutan nukleotida gen S dengan kode akses AB.113221.1 diketahui ada basa nukleotida yang berbeda yaitu pada kodon 117, kodon 161 dan kodon 184. Pada kodon 117 terjadi *silent mutation* karena mengkode asam amino yang sama yaitu serin. Pada kodon 161, DNA sisipan mengkode asam amino fenilalanin sedangkan urutan nukleotida gen S mengkode asam amino tirosin. Kedua asam amino ini termasuk dalam satu kelompok yaitu asam amino aromatik tetapi mempunyai sifat kepolaran yang berbeda, fenilalanin bersifat non polar sedangkan tirosin bersifat polar. Ternyata apabila dianalisa lebih lanjut perbedaan ini tidak menyebabkan perubahan *surface probability* yang berarti pada hasil prediksi epitop (dapat dilihat tidak adanya perubahan grafik yang berarti pada asam amino 85 protein S_{80-180} atau asam amino 117 protein S HBsAg). Hal ini dapat dilihat pada Gambar 8.

Pada kodon 184, DNA sisipan mengkode asm amino alanin sedangkan urutan nukleotida gen S mengkode asam amino valin. Kedua asam amino ini juga termasuk satu kelompok yaitu kelompok asam amino alifatik non polar. Berdasarkan analisa tersebut maka dapat diasumsikan protein yang berada di daerah determinan ‘a’ yang dikode oleh DNA sisipan dan urutan nukleotida gen S dengan kode akses AB113221.1 tidak mempunyai perbedaan konformasi.



Gambar 8 : Prediksi epitop linier S_{80-180} galur alami dan mutan G145R. 1) prediksi epitop linier S_{80-180} mutan G145R .2) prediksi epitop linier S_{80-180} galur alami

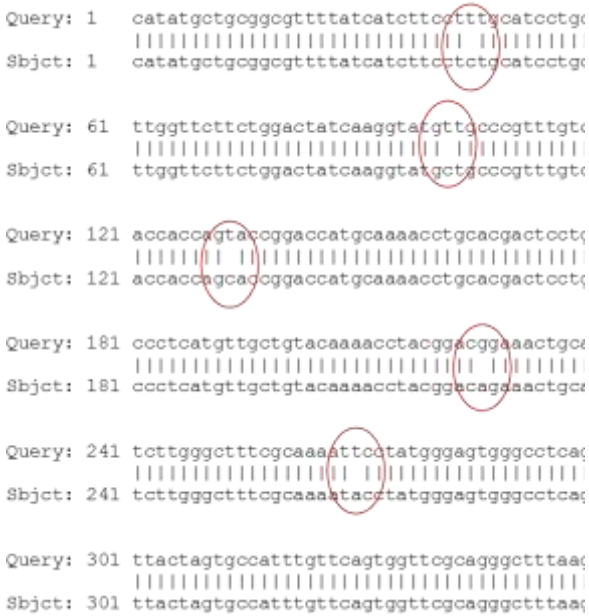
Hasil penentuan urutan nukleotida pada DNA sisipan pengkode S_{80-180} mutan G145R menunjukkan homologi 99% dengan urutan nukleotida HBV kode akses AB113220.1. Terdapat perbedaan urutan basa nukleotida yaitu pada kodon 104, kodon 145 dan kodon 184. Pada kodon 104 terjadi *silent mutation* karena urutan basa nukleotida yang berbeda pada kodon 104 ternyata mengkode asam amino yang sama yaitu leusin. Pada kodon 145, DNA sisipan dikode oleh basa nukleotida AGA yang mengkode asam amino arginine sedangkan urutan nukleotida HBV kode akses AB113220.1 mengkode asam amino glisin. Kedua asam amino ini merupakan golongan asam amino yang berbeda, arginin merupakan asam amino yang bersifat basa sedangkan glisin bersifat nonpolar. Perubahan ini terjadi di daerah MHR yang dapat mempengaruhi antigenitas dari protein S HBV sehingga tidak dapat dikenali lagi oleh anti HBsAg. Fenomena ini dikenal dengan mutan lolos vaksin. Pada kodon 184, DNA sisipan mengkode asam amino alanin sedangkan urutan nukleotida gen S mengkode valin. Kedua asam amino ini termasuk ke dalam satu kelompok yaitu asam amino alifatik non polar. Berdasarkan analisa tersebut dapat dikatakan DNA sisipan mengkode urutan nukleotida mutan G145R walaupun berdasarkan hasil analisa BLAST, terdapat mutasi pada kodon yang lain yang setelah dianalisa mutasi tersebut tidak menghasilkan perbedaan sifat asam aminonya. Hal ini dapat dilihat pada Gambar 9.



Gambar 9:; Hasil analisis BLAST penentuan urutan nukleotida gen pengkode protein S_{80-180} mutan G145R

Urutan basa nukleotida DNA pengkode S_{80-180} galur alami disejajarkan dengan urutan basa nukleotida DNA pengkode S_{80-180} G145R mutan menggunakan program *aligment two sequence* yang ada di BLAST. Hasil pensejajaran menunjukkan perbedaan basa nukleotida yaitu pada kodon 84, kodon 104, kodon 117, kodon 145 dan kodon 161. Pada kodon 84 dan kodon 104 ternyata mengkode asam amino yang sama yaitu leusin dan juga pada kodon 117 yang mengkode asam amino yang sama yaitu serin. Pada kodon 145 terjadi mutasi asam amino, dari asam amino glisin (GGA) menjadi asam amino arginin (AGA). Pada kodon 161, terjadi perbedaan urutan nukleotida, pada galur alami mengkode asam amino fenilalanin sedangkan mutan G145R mengkode asam amino tirosin yang berbeda sifat kepolarannya. Apabila dianalisa lebih lanjut dengan prediksi epitop yang dilihat dari bentuk grafik *surface* probability antara kedua asam amino ini (pada protein S_{80-180} berada pada posisi asam amino 85) tidak menunjukkan perubahan yang berarti. Analisis inilah yang digunakan pula untuk menjelaskan perbedaan asam amino yang dikode kodon 116 DNA pengkode S $_{80-180}$ galur alami dengan urutan nukleotida gen S dengan kode akses AB.113221.1. Hal ini dapat dilihat pada Gambar 10 dan 8.

Hasil prediksi epitop linier DNA sisipan menunjukan bahwa pada epitop S_{80-180} mutan G145R menunjukkan perbedaan bentuk grafik *surface probability* dibandingkan epitop S_{80-180} galur alami pada asam amino 69 dari protein S_{80-180} yang disebabkan karena perubahan asam amino glisin menjadi arginin, dapat dilihat pada Gambar 8.



Gambar 10: Hasil analisis *aligment two sequence* urutan nukleotida gen pengkode protein S_{80-180} galur alami dan mutan G145R

Hal ini menunjukkan bahwa perbedaan asam amino tersebut telah menambah sifat antigenitas protein mutan G145R yang implikasinya tidak dapat dikenali oleh antibody anti-HBsAg galur alami. Hasil prediksi epitop linier ini dapat menjelaskan terjadinya fenomena mutan lolos vaksin.

SIMPULAN

Hasil analisa karakterisasi plasmid pGEM-T rekombinan yang meliputi analisa migrasi, analisa PCR, analisa restriksi, dan penentuan urutan nukleotida menunjukan bahwa adanya DNA sisipan yaitu gen pengkode S_{80-180} galur alami dan mutan G145R pada vektor kloning pGEM-T. Berdasarkan analisa karakterisasi tersebut maka dapat disimpulkan telah didapatkan dua klon *E. coli* JM109 rekombinan yang masing-masing mengandung gen pengkode S_{80-180} galur alami dan mutan G145R dan telah dikonfirmasi kebenarannya dengan penentuan urutan nukleotida DNA sisipan

SARAN

Rekonstruksi gen pengkode S_{80-180} galur alami dan mutan G145R pada vektor ekspresi agar diperoleh protein S_{80-180} galur alami dan mutan.

DAFTAR PUSTAKA

Aprillia, H., 2004, **Penentuan Keberadaan *Vaccine Escape Mutant* dan Subtipe Virus Hepatitis B dari Beberapa Kota di Pulau Jawa,** Skripsi Departemen Farmasi FMIPA ITB, Bandung, 4-6.

Carman, W. F., A. R. Zanetti, P. Karayiannis, J. Waters, G. Manzillo, 1990, Vaccine-Induced Escape Mutant of Hepatitis B Virus, **Lancet,** 336, 325-329.

Chen, H. B., D. X. Fang, F. Q. li, H. Y. Jing, W. G. Tan and S. Q. Li, 2003, A Novel Hepatitis B Virus Mutant with A-to-G at nt551 in the Surface Antigen Gene, **World J. Gastroenterol.,** 9 (2), 304-308.

Chen, W. N. and C. J. Oon, 1999, Human Hepatitis B Virus Mutants : Significance of Molecular Changes, **FEBS Lett.,** 453 (3), 237-242.

Chen, W. N. and C. J. Oon, 2000, Hepatitis B Virus Surface Antigen (HBsAg) Mutants I Singapore Adult and Vaccinated Children with High Anti-Hepatitis B Virus Antibody Levels but Negative for HBsSAg, **J. Clin. Microbiol.,** 38(7), 2793-2794.

Chiou, H. L., T. S. Lee, J. Kuo, Y. C. Mau, and M. S. Ho, 1997, Altered Antigenicity of 'a' Determinant Variants of Hepatitis B, **J. Virol.,** 78, 2639-2645.

Coleman, P. F, 2006, Detecting Hepatitis B Surface Antigen Mutants, **Emerging Infection Diseases,** 12(2), 5-38**.**

Flint S. J., L. W. Enquist, R. M. Krug, and A. M. Skalka, 2000, **Virology : Molecular Biology, Pathogenesis, and Control**, ASM Press, Washington, 766.

Garcia, F., M. C. Bernal, A. Leyva, G. Piedrola and M. C. Maroto, 1995, Evaluation of Enzyme Immunoassay for Hepatitis B Virus DNA Based on Anti-Double-Stranded DNA, **J. Clin. Microbiol**, 33 (2), 413-415.

Glebe, D., M. Aliakbari, P. Krass, E. V. Knoop, K. P. Valerius, and W. H. Gerlich, 2003, Pre-S1 Antigen-Dependent Infection of *Tupaia*

Hepatocyte Cultures with Human Hepatitis B Virus, **J. Virol.,** 77(17), 9511-9521.

Ho, M. S., C. F. Lu, J. Kuo, Y. C. Mau, and W. W. Chao, 1995, A Family Cluster of an Immune Escape Variant of Hepatitis B Virus Infecting a Mother and Her Two Fully Immunized Children, **Clin. Diagnostic. Lab. Immunol.,** 2(6), 760-762.

Kumar A, and N. Joshi, 2001, Immunoprophylaxis of Hepatitis B Virus Infection, **IJMM.**, 19 (4), 1-10.

Lee, W. M., 1997, Hepatitis B Virus Infection, **N. Engl. J. Med**., 337 (24), 1733-1745.

Paulij, W. P., P. L. M de Wit, C. M. G. Sunnen, M. H. van Roosmalen, A. van Ettekoven, M. P. Cooreman, and R. A. Heijtink, 1999, Localization of a Unique Hepatitis B Virus Epitope Sheds New Light on the Structure of Hepatitis B Virus Surface Antigen, **J. Virol.,** 80**,** 2121-2126.

Prince, A. and D. Ganem, 2004, Hepatitis B Virus Infection-Natural History and Clinical Consequences, **N. Engl. J. Med.,** 450 (11), 1118-1129.

Qin, S., H. Tang, L. Zhao, F. He, Y. Lin, L. Liu, and X. He, 2003, Cloning of HBsAg-encoded Genes in Different Vectors and Their Expression in Eukaryotic Cell, **World J. Gastroenterol.,** 9(5), 1111-1113.

Seeger, C. and W. S. Mason, 2000, Hepatitis B Virus Biology, **Microbiol. Mol. Biol. Rev.,** 64(1), 51-68.

Singh, M., R. Cattaneo, and M. A. Billeter, 1999, A Recombinant Measles Virus Expressing Hepatitis B Virus Surface Antigen Induces Humoral Immune Responses in Genetically Modified Mice, **J. Virol.,** 73(6), 9511-9521.

Soussan, P., S. Pol, F. Garreau, C. Brechot, and D. Kremsdorf, 2000, Vaccination of Chronic Hepatitis B Virus Carries with PreS2/S Envelope Protein Is Not Associated with the Emergence of Envelope Escape Mutants, **J. Virol.,** 82, 367-371.