

Prediksi Epitop Sel T Sitotoksik dari Protein Selubung Virus Dengue melalui Pendekatan Immunoinformatika sebagai Kandidat Vaksin Dengue Berbasis Peptida

Siti Rasnawati Mony^{1*}, Muhammad Yusuf^{1,2}, Toto Subroto^{1,2}, Wahyu Widayat³, Mamay Syani⁴

¹Program Studi Magister Bioteknologi, Fakultas Sekolah Pascasarjana, Universitas Padjadjaran, Jl. Dipati Ukur No.35, Kota Bandung, Jawa Barat 40132, Indonesia.

²Departemen Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Padjadjaran, Jl. Raya Bandung-Sumedang km. 21 Jatinangor, Sumedang, Jawa Barat, 45363.

³Fakultas Farmasi, Universitas Mulawarman, Jl. Penajam, Kampus Unmul Gunung Kelua, Kota Samarinda, 75119, Indonesia.

⁴Jurusan Teknik Komputer dan Informatika, Politeknik TEDC Bandung, Jl. Politeknik - Pesantren Km. 2 Cibabat, Cimahi Utara, Indonesia.

*Penulis korespondensi: rasnawati.siti@gmail.com

DOI: <https://doi.org/10.24198/cna.v12.n1.45400>

Abstrak: Infeksi virus dengue (DENV) menjadi ancaman kesehatan global yang terus mengalami peningkatan kasus pada setiap tahun terutama pada musim penghujan, di daerah beriklim tropis maupun subtropis. Vaksin dengue yang tersedia saat ini berbahan dasar virus yang dilemahkan dinilai memiliki potensi *antibody-dependent enhancement* (ADE) yang memicu terbentuknya badai sitokin, berujung pada kondisi imunopatogenik. Melalui pendekatan immunoinformatika, penelitian ini bertujuan untuk mengidentifikasi peptida sebagai epitop potensial dari protein selubung DENV serotipe 1-4 yang dapat berinteraksi dengan salah satu HLA dominan dan paling banyak dipelajari yaitu HLA-A*02:01, serta HLA-A*24:02 dan HLA-A*24:07, keduanya merupakan HLA kelas I yang paling dominan di populasi Indonesia. Sebanyak 43 protein selubung DENV disejajarkan dan diamati nilai entropi untuk memilih satu urutan residu dari setiap serotipe DENV yang lestari. Penyaringan immunoinformatika dilanjutkan sampai mendapatkan peptida yang memenuhi kriteria seleksi epitop sebagai kandidat epitop vaksin dengue yaitu bersifat antigenik, tidak homolog dengan protein manusia, bukan alergen, dan tidak toksik. Didapatkan 20 peptida memenuhi kriteria diantaranya 10/20 untuk HLA-A*02:01 serta 4/17 dan 6/17 yang mengikat HLA-A*24:02 dan HLA-A*24:07 secara berurutan. Penelitian ini merupakan awal dalam perancangan vaksin peptida dengue yang masih harus dilanjutkan dan dibuktikan secara *in silico* dengan melihat interaksi molekuler tiga dimensi antara kandidat epitop dengan masing – masing alel.

Kata kunci: virus dengue, protein selubung, peptida, epitop potensial, immunoinformatika, vaksin, sel T sitotoksik

Abstract: Dengue virus (DENV) infection is a global health concern, escalating annually, especially during tropical and subtropical rainy seasons. The existing dengue vaccine, relying on a weakened virus, raises concerns about antibody-dependent enhancement (ADE), triggering cytokine storms and immunopathogenic conditions. This research utilizes an immunoinformatics approach to pinpoint potential epitopes within DENV serotype 1-4 envelope proteins that can interact with one of the most dominant and studied HLA, namely HLA-A*02:01, as well as HLA-A*24:02 and HLA-A*24:07 which are predominant in the Indonesian population. Aligning 43 DENV envelope proteins and employing entropy values identified conserved residue sequences. Peptide screening, considering antigenicity, dissimilarity to human proteins, non-allergenicity, and non-toxicity, yielded 20 qualifying peptides (10/20 for HLA-A*02:01, 4/17 for HLA-A*24:02, and 6/17 for HLA-A*24:07). This research initiates the development of a dengue peptide vaccine, necessitating further *in silico* validation through three-dimensional molecular interaction analysis between epitope candidates and genotypes.

Keywords: dengue virus, envelope protein, peptide, potential epitope, immunoinformatics, vaccine, cytotoxic T lymphocytes

PENDAHULUAN

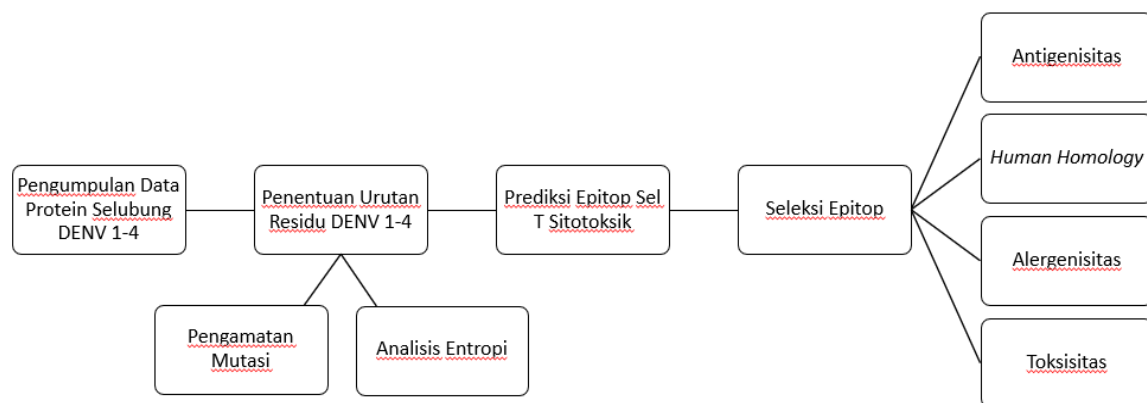
Virus dengue (DENV) adalah virus RNA untai tunggal dengan satu *open reading frame* (ORF). ORF mengkode tiga protein struktural yaitu protein kapsid (C), protein prekursor membran (prM), protein selubung atau *envelope* (E) dan tujuh protein non struktural diantaranya NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, dan NS5. Keseluruhan dari protein tersebut memiliki fungsi yang mendukung proses masuk dan replikasi virus di dalam sel inang (Ali *et al.* 2017). DENV memiliki empat serotipe yaitu DENV-1, DENV-2, DENV-3, dan DENV-4. Keempat serotipe ini bersirkulasi pada daerah tropis dan subtropis di seluruh belahan dunia terutama di Asia dan Amerika Latin (ECDC 2022). Di seluruh negara berkembang, virus dengue meningkatkan morbiditas, mortalitas, dan rawat inap setiap tahun, terutama selama musim penghujan, vektor dari virus ini yaitu nyamuk terutama spesies *Aedes aegypti* dan *Aedes albopictus* berkembang biak dengan pesat. Selain itu, karena karakteristiknya yang unik, DENV dapat merusak sistem kekebalan manusia dan menyebabkan berbagai manifestasi klinis, mulai dari ringan hingga parah yang jika tidak ditangani dengan cepat dapat menyebabkan kematian. Sebagian besar informasi yang diketahui bahwa imunopatogenik yang disebabkan oleh DENV dengan mekanisme diketahui berkaitan erat dengan mekanisme *antibody-dependent enhancement* (ADE). Dalam mekanisme ini, reseptor lain pada sel imun (reseptor FC γ) membantu virus masuk ke dalam sel imun, yang kemudian bereplikasi dan melepaskan virus yang telah berkembang biak. Ini menghasilkan lebih banyak sel yang terinfeksi yang kemudian memperparah produksi sitokin dan kemokin berlebih yang mengaktifkan banyak sel efektor sehingga menyebabkan peningkatan inflamasi dan apoptosis, serta kebocoran plasma ke dalam jaringan yang disertai syok. Kondisi inilah yang meningkatkan derajat keparahan penyakit menjadi sindrom syok dengue (SSD) yang mengarah pada kematian (Carrington & Simmons 2014; Nanaware *et al.* 2021).

Pertambahan kasus infeksi DENV terus meningkat setiap tahunnya, terjadi juga di Indonesia. Hal ini menuntut upaya dalam pencegahan infeksi DENV. Berbagai upaya dari segi pencegahan penularan terus dilakukan seperti pengendalian jumlah nyamuk yang dinilai cukup berhasil menurunkan angka kasus namun tetap memiliki kelemahan sehingga diperlukan juga upaya pencegahan lain yaitu dengan mengembangkan vaksin dengue. Di Indonesia terdapat dua jenis vaksin dengue yang sudah memiliki izin edar dari Badan Pengawas Obat dan Makanan (BPOM) dengan jenis *live attenuated vaccine* (LAV) dengan menyatukan keempat serotipe sehingga disebut *tetravalent dengue vaccine* (TDV) (BPOM 2022, 2017). Vaksin LAV memiliki stimulator imunologis sangat kuat dan ideal dalam menghasilkan respon imun yang diperlukan

untuk proteksi dari paparan virus selanjutnya. Namun karena bahan dasar vaksin ini berupa organisme hidup maka ada risiko untuk kembali ke bentuk patogen aslinya yang pada kondisi tertentu mampu menyebabkan penyakit sehingga penggunaannya menjadi terbatas jika pada individu rentan terutama dengan imunokompromais. Selain itu, pengembangan vaksin jenis ini di Indonesia akan tidak mudah karena membutuhkan dukungan teknis, waktu dan biaya yang sangat tidak sedikit (Hertanto & Novita 2021).

Perkembangan vaksinologi memberikan alternatif untuk mendesain vaksin yang disesuaikan dengan sumber daya yang dimiliki misalnya vaksin berbasis peptida. Perancangan vaksin peptida melalui metode vaksinologi terbalik (*reverse vaccinology*) secara imunoinformatika memiliki efisiensi yang tinggi dari segi biaya dan waktu dibandingkan vaksin konvensional. Selain itu, dinilai lebih aman dibandingkan vaksin berbahan dasar virus yang dilemahkan karena tidak memiliki risiko kembali ke bentuk patogen asli. Vaksin berbasis peptida juga dinilai memungkinkan untuk dapat menginduksi respon imun spesifik melalui pola pengenalan epitop vaksin peptida sintetik dengan reseptor pada sel target. Hal ini memungkinkan karena dalam respon imun adaptif terhadap antigen, reseptor sel T dan sel B hanya akan mengenali bagian pendek dari antigen (epitop) yang sudah dipilih dari protein antigenik dan diketahui dapat berikatan dengan reseptor sel target (Reginald *et al.* 2018). Kemajuan teknologi komputerisasi, informasi terkait genetik organisme dapat diakses melalui database secara luas dengan mudah sehingga sangat mendukung penelitian dalam pengembangan disain vaksin berbasis peptida (Biswas *et al.* 2021; Hasan *et al.* 2013). Keunggulan lain dari vaksin ini meliputi spesifisitas yang tinggi, cenderung tidak menyebabkan alergi dan respon autoimun, lebih *tolerable* terhadap varian atau mutasi pada organisme target, relatif lebih mudah pada proses pemurnian, mendukung peningkatan kapasitas produksi, biaya produksi yang efisien, larut dalam air, serta stabil dalam penyimpanan baku kering (Subroto dkk. 2013).

Dalam konteks penelitian ini, terdapat kebaruan signifikan karena fokus pada pendekatan imunoinformatika untuk mencari epitop virus dengue dari sekuen virus yang bersirkulasi di Indonesia, dengan penekanan khusus pada alel dominan di Indonesia, yaitu HLA-A*24:02 dan HLA-A*24:07. Sebelumnya, banyak penelitian telah mengadopsi metode serupa, tetapi belum ada yang memeriksa secara khusus alel dominan Indonesia, sambil membandingkan hasil prediksi epitop dengan HLA yang umum dan terkaji yaitu HLA-A*02:01 seperti yang akan dilakukan pada penelitian ini. Dengan mengintegrasikan analisis tersebut, maka diharapkan mampu memberikan wawasan baru terkait potensial epitop pada virus dengue, khususnya dalam konteks populasi Indonesia, serta mengisi kesenjangan pengetahuan yang sebelumnya belum tercakup.



Gambar 1. Diagram alir penyaringan imunoinformatika epitop potensial dari protein selubung DENV 1-4

BAHAN DAN METODE

Desain penelitian ini merujuk pada beberapa studi perancangan vaksin peptida secara *in silico* melalui pendekatan imunoinformatika (Tambunan *et al.* 2016; Taupiqurrohman dkk. 2016). Alat yang digunakan dalam penelitian ini terbagi menjadi dua bagian yaitu perangkat keras dan perangkat lunak. Perangkat keras berupa satu unit laptop dengan spesifikasi sebagai berikut: Prosesor AMD Ryzen 7 3700U dengan Radeon Vega Mobile Gfx 2.30 GHz, Memori RAM 12.0 GB, Solid-State Drive (SSD) 512 GB, dengan sistem operasi Windows. Sedangkan perangkat lunak berupa program maupun *web server* yang digunakan untuk memprediksi kandidat epitop potensial. Gambar 1 menunjukkan proses penyaringan imunoinformatika untuk menemukan epitop potensial pada penelitian ini.

Pengumpulan Data Protein Selubung Serotipe DENV

Dilakukan pengumpulan sebanyak 43 urutan protein selubung dari keseluruhan strain DENV (*GenBank* ID QCE20908.1 – QCE20950.1) yaitu 12 urutan protein selubung DENV-1, tiga urutan protein selubung DENV-2, 19 urutan protein selubung DENV-3 dan sembilan urutan protein selubung DENV-4 yang disimpan dalam format FASTA (Utama *et al.* 2019).

Penentuan Urutan Residu Protein Selubung DENV 1-4

Urutan protein selubung DENV yang terkumpul pada setiap serotipe diamati *conserved region* melalui pensejajaran menggunakan Biological Sequence Alignment Editor (BioEdit) 7.0.5.3 (10/28/05) (Alzohairy 2011) untuk melihat keberadaan mutasi substitusi serta nilai entropi dari hasil analisis Antigenic Variability Analyzer (AVANA) 0.31 (Khan *et al.* 2006). Satu urutan residu protein terpilih pada setiap serotipe DENV akan mewakili untuk prediksi epitop sel T sitotoksik.

Prediksi Epitop Sel T Sitotoksik

NetMHCpan-4.1 digunakan sebagai *web server* untuk memprediksi epitop sel T sitotoksik, memiliki akurasi prediksi sebesar 90 – 95%. Panjang peptida ditentukan sebanyak 9 mer dengan alel HLA yang dipilih adalah HLA-A*02:01, HLA-A*24:02, dan HLA-A*24:07. *Web server* ini memiliki ambang batas kurang dari 0,5% sebagai kategori peptida pengikat kuat dan kurang dari 2% untuk peptida pengikat lemah (Khairkhah *et al.* 2020; Reynisson *et al.* 2020).

Seleksi Epitop meliputi Antigenisitas, Human Homology, Alergenisitas, dan Toksisitas

Antigenisitas epitop ditentukan menggunakan VaxiJen v.2.0, dengan nilai ambang batas untuk virus adalah 0.4 (Doytchinova & Flower 2007). Dalam memprediksi *human homology*, BLASTP digunakan dengan memilih organisme *Homo sapiens*. Pada BLASTP yang diamati adalah nilai E (Naveed *et al.* 2022). Selain itu, untuk menghasilkan data alergenitas digunakan AllerTOP v.2.0 dan AllerCatPro 2.0. AllerCatPro 2.0 memiliki tingkat akurasi prediksi alergen yang signifikan berbeda dengan metode pengukuran lain yaitu mencapai 84% (Dimitrov *et al.* 2014; Nguyen *et al.* 2022). Selanjutnya, toksisitas epitop diamati menggunakan ToxinPred. *Web server* ini menggunakan algoritma *support vector machine* (SVM) untuk membedakan epitop yang masuk dalam kategori toksin dan non-toksin (Gupta *et al.* 2015; Gupta *et al.* 2013).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Data urutan residu yang terkumpul dianalisis berdasarkan *conserved region* untuk kemudian dipilih satu urutan residu protein selubung sebagai perwakilan dari setiap serotipe DENV. Hasil pensejajaran urutan protein menggunakan ClustalW pada BioEdit memungkinkan untuk menentukan daerah yang dilestarikan melalui keberadaan mutasi substitusi. Data pengamatan tersebut digabungkan dengan pengamatan nilai entropi melalui analisis

AVANA. Menurut Khan *et al.* (2006), metode yang didasarkan pada nilai entropi dapat mengukur tingkat variabilitas peptida tanpa bergantung dengan panjang peptida itu sendiri serta mampu memberikan kesimpulan terkait stabilitas evolusinya. Nilai entropi rendah mengindikasikan peptida yang stabil, dimana nilai entropi nol menunjukkan bahwa peptida nonamer 100% dilestarikan. Satu urutan residu dipilih untuk mewakili setiap serotipe adalah yang memiliki mutasi substitusi paling sedikit dan nilai entropi peptida paling rendah. Perwakilan urutan residu tersebut untuk DENV-1 adalah QCE20917.1, sedangkan untuk serotipe lainnya secara berurutan adalah QCE20922.1, QCE20931.1, dan QCE20942.1. Selanjutnya keempat urutan protein selubung setiap serotipe DENV tersebut digunakan untuk prediksi epitop sel T sitotoksik (Alzohairy 2011; Khan *et al.* 2006).

Analisa Epitop Sel T Sitotoksik

Pemilihan peptida sebagai epitop potensial sel T sitotoksik menggunakan NetMHCpan-4.1 didasarkan pada %Rank dimana nilai tersebut menggambarkan peringkat skor pengikatan yang diprediksi melalui komparasi dengan kelompok acak dari peptida alami. Pengukuran ini tidak dipengaruhi oleh bias dari suatu molekul tertentu terhadap rata-rata prediksi afinitas yang lebih tinggi atau lebih rendah. Peptida pengikat kuat didefinisikan memiliki %rank <0.5 sedangkan peptida pengikat yang lemah dengan %rank >2 (Khairkhan *et al.* 2020). Menurut Reynisson *et al.* (2020), pemilihan peptida hasil analisis pengolahan NetMHCpan-4.1 sebaiknya didasarkan pada %rank daripada skor pengikatan. Pada Tabel 1 tersaji hasil analisis NetMHCpan 4.1 berisi epitop sel T sitotoksik hasil prediksi dengan HLA-A*02:01, HLA-A*24:02, dan HLA-A*24:07. Pemilihan alel HLA-A*02:01 karena distribusi alel tersebut tersebar merata di seluruh negara, selain itu merupakan salah satu HLA kelas I yang paling banyak dipelajari, serta mengikat peptida dari berbagai virus termasuk virus dengue (Imusyn 2023). Sedangkan HLA-A*24:02 dan HLA-A*24:07 dipilih karena diketahui kedua alel tersebut termasuk ke dalam lima alel yang paling dominan ditemukan di populasi Indonesia (Pradana *et al.* 2020; Gustiananda *et al.* 2021). Dari hasil NetMHCpan 4.1 dipilih sebanyak 20 peptida hasil prediksi yaitu empat dari DENV-1, delapan dari DENV-2, empat dari DENV-3 dan empat dari DENV-4. Tidak ditemukan peptida yang tumpang tindih antar serotipe DENV.

Antigenisitas, Human Homology, Alergenisitas, dan Toksisitas

Prediksi antigenisitas dilakukan untuk memeriksa sifat antigenik yang terdapat pada peptida. Peptida yang dipilih sebagai kandidat epitop potensial adalah peptida yang bersifat antigen sehingga dapat dikenali oleh reseptor sel imun untuk memicu terbentuknya

respon kekebalan. VaxiJen 2.0 memiliki akurasi sebesar 70 – 87% dalam memprediksi sifat antigenik. Web server ini memprediksi antigen berdasarkan sifat fisikokimia dan tidak terpengaruh oleh panjang urutan maupun keselarasan dari peptida yang diuji (Doytchinova & Flower 2007). Data pada Tabel 2 menunjukkan hasil prediksi antigenisitas dari setiap peptida pada masing – masing serotipe virus DENV. Sebanyak 20/54 peptida diprediksi sebagai antigen yang berarti memiliki sifat antigenik sehingga mampu memicu terbentuknya respon kekebalan tubuh. Serotipe DENV-1 memiliki dua peptida bersifat antigenik, sedangkan untuk serotipe lainnya yaitu DENV-2, DENV-3 dan DENV-4 yaitu sebanyak empat, dua, dan dua peptida secara berurutan.

Penentuan *human homology* peptida kandidat vaksin MHC kelas I dilakukan untuk menghindari respon autoimun oleh sel manusia. Pada hasil BLASTP tersaji tabel yang mencakup skor bit untuk setiap penjejakan beserta nilai E, dimana nilai E ini menunjukkan jumlah keselarasan dengan skor bit tertentu. Merujuk pada Naveed *et al.* (2022), nilai E yang dilaporkan sebagai nol mengindikasikan adanya keselarasan identik atau hampir identik dengan protein organisme target. Nilai ambang batas dari nilai E sebesar >0.06 menunjukkan tidak adanya keselarasan atau homologi antara peptida yang diuji dengan protein manusia. Pada Tabel 2. Dapat dilihat bahwa keseluruhan peptida memiliki nilai E > 0.06 yang berarti tidak ada peptida yang homolog dengan protein manusia.

Dalam pencarian peptida potensial sebagai kandidat vaksin, peptida yang dipilih harus tidak bersifat alergen supaya aman digunakan karena tidak menyebabkan reaksi alergi. Beberapa faktor yang berkontribusi terhadap alergenitas dari suatu protein secara keseluruhan diantaranya sisi pemotongan enzim, kestabilan protein yang berkaitan dengan sifat fisikokimia, serta modifikasi pasca-translasi. AllerTOP v.2.0 dan AllerCatPro 2.0 merupakan *web server* yang digunakan untuk memprediksi alergenitas peptida pada penelitian ini. AllerTOP v.2.0 memprediksi potensi alergenik urutan protein berdasarkan deskriptor asam amino, perhitungan hidrofobisitas residu, ukuran, kelimpahan, kecenderungan pembentukan struktur α -helix dan β -sheet sedangkan AllerCatPro 2.0 memprediksi alergen berdasarkan kemiripan urutan asam amino beserta struktur tiga dimensinya yang dibandingkan dengan data set paling komprehensif dari berisi kumpulan protein yang berhubungan dengan alergenitas. Tujuan penggunaan kedua *web server* ini adalah untuk melengkapi dan memeriksa ulang prediksi alergenitas menggunakan *web server* yang memiliki tingkat akurasi berbeda. Menurut Nguyen *et al.* (2022), AllerCatPro 2.0 memiliki tingkat akurasi prediksi alergen yang signifikan berbeda dengan metode pengukuran lain yaitu mencapai 84%

Tabel 1. Identifikasi epitop sel T sitotoksik menggunakan NetMHCpan 4.1

Serotype DENV	Allel	Posisi	Panjang	Peptida	% Rank EL
DENV-1	HLA-A*02:01	424-432	9	SIGGVFTSV	0.184
	HLA-A*02:01	200-208	9	TMKEKSWLV	0.208
	HLA-A*02:01	206-214	9	WLVHKQWFL	0.314
	HLA-A*02:01	350-358	9	RLITANPIV	0.330
	HLA-A*24:02	298-306	9	SYVMCTGSF	0.351
	HLA-A*24:02	205-213	9	SWLVHKQWF	0.355
	HLA-A*24:02	212-220	9	WFLDLPLPW	0.396
	HLA-A*24:02	390-398	9	SWFKKGSSI	0.460
	HLA-A*24:07	390-398	9	SWFKKGSSI	0.296
	HLA-A*24:07	298-306	9	SYVMCTGSF	0.418
	HLA-A*24:07	447-455	9	LFSGVSWTM	0.418
	HLA-A*24:07	205-213	9	SWLVHKQWF	0.464
DENV-2	HLA-A*24:07	212-220	9	WFLDLPLPW	0.470
	HLA-A*02:01	213-221	9	FLDLPLPWL	0.058
	HLA-A*02:01	346-354	9	HVLGRLITV	0.080
	HLA-A*02:01	431-439	9	SIGKALHGV	0.176
	HLA-A*02:01	350-358	9	RLITVNPIV	0.197
	HLA-A*02:01	474-482	9	SLSVSLVLV	0.201
	HLA-A*02:01	424-432	9	SLGGVFTSI	0.225
	HLA-A*02:01	476-484	9	SVSLVLVGV	0.471
	HLA-A*02:01	206-214	9	WLVHRQWFL	0.488
	HLA-A*24:02	298-306	9	SYVMCTGKF	0.254
	HLA-A*24:02	232-240	9	IQKETLVTF	0.297
	HLA-A*24:02	212-220	9	WFLDLPLPW	0.396
DENV-3	HLA-A*24:02	447-455	9	AFSGVSWTM	0.410
	HLA-A*24:02	390-398	9	SWFKKGSSI	0.460
	HLA-A*24:07	447-455	9	AFSGVSWTM	0.285
	HLA-A*24:07	390-398	9	SWFKKGSSI	0.296
	HLA-A*24:07	298-306	9	SYVMCTGKF	0.335
	HLA-A*24:07	232-240	9	IQKETLVTF	0.371
	HLA-A*24:07	212-220	9	WFLDLPLPW	0.470
	HLA-A*24:07	271-279	9	QMSSGNLLF	0.492
	HLA-A*02:01	429-437	9	SLGKMVHQI	0.162
	HLA-A*02:01	106-114	9	GLFGKGSIV	0.166
	HLA-A*02:01	444-452	9	ALFSGVSWI	0.174
	HLA-A*02:01	348-356	9	RLITANPVV	0.239
DENV-4	HLA-A*24:02	296-304	9	SYAMCSNAF	0.194
	HLA-A*24:02	210-218	9	WFFDLPLPW	0.413
	HLA-A*24:02	203-211	9	AWMVHRQWF	0.477
	HLA-A*24:07	296-304	9	SYAMCSNAF	0.233
	HLA-A*24:07	210-218	9	WFFDLPLPW	0.415
	HLA-A*02:01	431-439	9	SLGKAVHGV	0.024
	HLA-A*02:01	206-214	9	WLVHKQWFL	0.314
	HLA-A*02:01	33-41	9	TMAQKGPTL	0.424
	HLA-A*02:01	124-132	9	KITGNLVQI	0.495
	HLA-A*24:02	232-240	9	NYKERMVTF	0.024
	HLA-A*24:02	439-447	9	VFGSVYTTM	0.297
	HLA-A*24:02	205-213	9	TWLVHKQWF	0.357
DENV-4	HLA-A*24:02	298-306	9	SYTMCSGKF	0.392
	HLA-A*24:02	212-220	9	WFLDLPLPW	0.396
	HLA-A*24:07	232-240	9	NYKERMVTF	0.060
	HLA-A*24:07	439-447	9	VFGSVYTTM	0.202
	HLA-A*24:07	212-220	9	WFLDLPLPW	0.470
	HLA-A*24:07	205-213	9	TWLVHKQWF	0.495

sedangkan AllerTOPv.2.0 hanya sebesar 51% (Dimitrov *et al.* 2014; Nguyen *et al.* 2022).

Pada Tabel 2 diperlihatkan hasil prediksi alergenitas menggunakan AllerTOP v.2.0 memiliki perbedaan dengan hasil AllerCatPro 2.0. Pada hasil AllerCatPro 2.0, seluruh peptida diprediksi sebagai non-alergen sedangkan AllerTOP v.2.0 memprediksi

20/54 peptida merupakan alergen. Pada serotype DENV-1 alel HLA-A*02:01 khususnya, hasil AllerTOP v.2.0 menunjukkan tidak satupun peptida diprediksi sebagai non-alergen sehingga pemilihan peptida didasarkan pada hasil prediksi AllerCatPro 2.0. Komparasi hasil dari kedua *web server* ini

Tabel 2. Hasil seleksi epitop meliputi antigenisitas, human homology, alergenitas, dan toksisitas

Strain DENV	Allel	Epitop CTL	Human Homology	Antigenisitas	Alergenitas (AllerTOP v.2.0)	Antigenisitas (AllerCatPro 2.0)	Toksitas
DENV-1	HLA-A*02:01	SIGGVFTSV	Non-homolog	Antigen	Alergen	Non-alergen	Non-toksin
	HLA-A*02:01	TMKEKSWLV	Non-homolog	Antigen	Alergen	Non-alergen	Non-toksin
	HLA-A*02:01	WLVHKQWFL	Non-homolog	Non-antigen	Alergen	Non-alergen	Non-toksin
	HLA-A*02:01	RLITANPIV	Non-homolog	Non-antigen	Alergen	Non-alergen	Non-toksin
	HLA-A*24:02	SYVMCTGSF	Non-homolog	Non-antigen	Non-alergen	Non-alergen	Non-toksin
	HLA-A*24:02	SWLVHKQWF	Non-homolog	Non-antigen	Alergen	Non-alergen	Non-toksin
	HLA-A*24:02	WFLDLPLPW	Non-homolog	Non-antigen	Non-alergen	Non-alergen	Non-toksin
	HLA-A*24:02	SWFKKGSSI	Non-homolog	Antigen	Non-alergen	Non-alergen	Non-toksin
	HLA-A*24:07	SWFKKGSSI	Non-homolog	Antigen	Non-alergen	Non-alergen	Non-toksin
	HLA-A*24:07	SYVMCTGSF	Non-homolog	Non-antigen	Non-alergen	Non-alergen	Non-toksin
	HLA-A*24:07	LFSGVSWTM	Non-homolog	Antigen	Alergen	Non-alergen	Non-toksin
	HLA-A*24:07	SWLVHKQWF	Non-homolog	Non-antigen	Alergen	Non-alergen	Non-toksin
DENV-2	HLA-A*24:07	WFLDLPLPW	Non-homolog	Non-antigen	Non-alergen	Non-alergen	Non-toksin
	HLA-A*02:01	FLLDLPLPW	Non-homolog	Antigen	Alergen	Non-alergen	Non-toksin
	HLA-A*02:01	HVLGRLITV	Non-homolog	Non-antigen	Alergen	Non-alergen	Non-toksin
	HLA-A*02:01	SIGKALHGV	Non-homolog	Non-antigen	Non-alergen	Non-alergen	Non-toksin
	HLA-A*02:01	RLITVNPIV	Non-homolog	Non-antigen	Alergen	Non-alergen	Non-toksin
	HLA-A*02:01	SLSVSLVLV	Non-homolog	Antigen	Non-alergen	Non-alergen	Non-toksin
	HLA-A*02:01	SLGGVFTSI	Non-homolog	Antigen	Non-alergen	Non-alergen	Non-toksin
	HLA-A*02:01	SVSLVLVGV	Non-homolog	Antigen	Non-alergen	Non-alergen	Non-toksin
	HLA-A*02:01	WLVHRQWFL	Non-homolog	Non-antigen	Alergen	Non-alergen	Non-toksin
	HLA-A*24:02	SYSMCTGKF	Non-homolog	Non-antigen	Non-alergen	Non-alergen	Non-toksin
	HLA-A*24:02	IQKETLVTF	Non-homolog	Non-antigen	Alergen	Non-alergen	Non-toksin
	HLA-A*24:02	WFLDLPLPW	Non-homolog	Non-antigen	Non-alergen	Non-alergen	Non-toksin
	HLA-A*24:02	AFSGVSWTM	Non-homolog	Antigen	Alergen	Non-alergen	Non-toksin
	HLA-A*24:02	SWFKKGSSI	Non-homolog	Antigen	Non-alergen	Non-alergen	Non-toksin
	HLA-A*24:07	AFSGVSWTM	Non-homolog	Antigen	Alergen	Non-alergen	Non-toksin
	HLA-A*24:07	SWFKKGSSI	Non-homolog	Antigen	Non-alergen	Non-alergen	Non-toksin
	HLA-A*24:07	SYSMCTGKF	Non-homolog	Non-antigen	Non-alergen	Non-alergen	Non-toksin
	HLA-A*24:07	IQKETLVTF	Non-homolog	Non-antigen	Alergen	Non-alergen	Non-toksin
DENV-3	HLA-A*24:07	WFLDLPLPW	Non-homolog	Non-antigen	Non-alergen	Non-alergen	Non-toksin
	HLA-A*24:07	QMSSGNLLF	Non-homolog	Antigen	Alergen	Non-alergen	Non-toksin
	HLA-A*02:01	SLGKMVHQI	Non-homolog	Non-antigen	Non-alergen	Non-alergen	Non-toksin
	HLA-A*02:01	GLFGKGSVL	Non-homolog	Antigen	Alergen	Non-alergen	Non-toksin
	HLA-A*02:01	ALFSGVSWI	Non-homolog	Antigen	Non-alergen	Non-alergen	Non-toksin
	HLA-A*02:01	RLITANPVV	Non-homolog	Non-antigen	Alergen	Non-alergen	Non-toksin
	HLA-A*24:02	SYAMCSNAF	Non-homolog	Non-antigen	Alergen	Non-alergen	Non-toksin
	HLA-A*24:02	WFFDLPLPW	Non-homolog	Non-antigen	Non-alergen	Non-alergen	Non-toksin
DENV-4	HLA-A*24:02	AWMVHRQWI	Non-homolog	Non-antigen	Non-alergen	Non-alergen	Non-toksin
	HLA-A*24:07	SYAMCSNAF	Non-homolog	Non-antigen	Alergen	Non-alergen	Non-toksin
	HLA-A*24:07	WFFDLPLPW	Non-homolog	Non-antigen	Non-alergen	Non-alergen	Non-toksin
	HLA-A*02:01	SLGKAVHQV	Non-homolog	Antigen	Non-alergen	Non-alergen	Non-toksin
	HLA-A*02:01	WLVHKQWFL	Non-homolog	Non-antigen	Alergen	Non-alergen	Non-toksin
	HLA-A*02:01	TMAQKPTL	Non-homolog	Antigen	Alergen	Non-alergen	Non-toksin
	HLA-A*02:01	KITGNLVQI	Non-homolog	Non-antigen	Non-alergen	Non-alergen	Non-toksin
	HLA-A*24:02	NYKERMVTF	Non-homolog	Antigen	Non-alergen	Non-alergen	Non-toksin
	HLA-A*24:02	VFGSVYTTM	Non-homolog	Non-antigen	Non-alergen	Non-alergen	Non-toksin
	HLA-A*24:02	TWLVHKQWF	Non-homolog	Non-antigen	Alergen	Non-alergen	Non-toksin
	HLA-A*24:02	SYTMCSSGKF	Non-homolog	Non-antigen	Alergen	Non-alergen	Non-toksin
	HLA-A*24:02	WFLDLPLPW	Non-homolog	Non-antigen	Non-alergen	Non-alergen	Non-toksin
	HLA-A*24:07	NYKERMVTF	Non-homolog	Antigen	Non-alergen	Non-alergen	Non-toksin
	HLA-A*24:07	VFGSVYTTM	Non-homolog	Non-antigen	Non-alergen	Non-alergen	Non-toksin
	HLA-A*24:07	WFLDLPLPW	Non-homolog	Non-antigen	Non-alergen	Non-alergen	Non-toksin
	HLA-A*24:07	TWLVHKQWF	Non-homolog	Non-antigen	Alergen	Non-alergen	Non-toksin

digunakan untuk mendapatkan peptida non-alergen pada setiap serotipe yang dapat dianalisis lebih lanjut sebagai epitop potensial.

Toksitas terhadap sel eukariotik merupakan salah satu syarat utama dalam pengembangan vaksin maupun upaya terapi berbasis peptida. Peptida yang memiliki efek sitotoksik dapat membahayakan integritas membran sel. Dalam pengembangan vaksin peptida secara imunoinformatika, prediksi toksisitas dilakukan untuk dapat memilih maupun

memodifikasi peptida yang tidak bersifat toksik ataupun meminimalkan sifat toksisitasnya. Modifikasi toksisitas ini memungkinkan untuk mendesain peptida atau protein dengan toksisitas yang diinginkan dengan cara memutasi jumlah minimum asam amino. Pada penelitian ini *web server* ToxinPred digunakan untuk prediksi toksisitas peptida dengan akurasi prediksi sekitar 90%. ToxinPred dikembangkan dalam memprediksi peptida toksin atau peptida non-toksin, melakukan

modifikasi berupa mutasi minimum pada peptida untuk menurunkan atau meningkatkan efek toksisitasnya, serta untuk mengamati daerah toksik pada protein (Gupta *et al.* 2015, 2013). Dari data yang disajikan pada Tabel 2 hasil prediksi toksisitas menunjukkan bahwa tidak ada peptida bersifat toksik. Peptida yang tidak bersifat toksik merupakan salah satu kriteria yang harus terpenuhi saat mendesain vaksin berbasis peptida.

Analisa Hasil Seleksi Epitop

Melalui pendekatan komputasi ini, dilakukan penyaringan epitop dengan tujuan memilih peptida yang aman sebagai kandidat epitop potensial. Hasil analisis pada Tabel 2 menunjukkan bahwa 20 dari 54 peptida memenuhi kriteria seleksi epitop, yakni tidak memiliki homologi dengan protein manusia, bersifat antigenik, non-alergenik, dan non-toksik. Peptida-peptida ini diidentifikasi sebagai kandidat epitop potensial. Pada prediksi alel HLA-A*02:01, beberapa peptida muncul, seperti SIGGVFTSV dan TMKEKSWLV dari DENV-1, FLDLPLPW, SLSVSLVLV, SLGGVFTSI, dan SVSLVLGV dari DENV-2, serta GLFGKGSLV dan ALFSGVSWI dari DENV-3, dan peptida SLGKAVHQV serta TMAQGKPTL dari DENV-4. Pada HLA-A*24:02, tidak terdapat peptida DENV-3 yang memenuhi kriteria seleksi epitop. Namun, ditemukan peptida seperti SWFKKGSSI dari DENV-1, AFSGVSWTM dan SWFKKGSSI dari DENV-2, serta NYKERMVTF dari DENV-4. Temuan serupa juga terjadi pada HLA-A*24:07 dengan peptida dari DENV-1, DENV-2, dan DENV-4, yaitu SWFKKGSSI, LFSGVSWTM, dan AFSGVSWTM dari DENV-1, SWFKKGSSI dan QMSSGNLLF dari DENV-2, serta NYKERMVTF dari DENV-4.

Komparasi Hasil Prediksi Epitop antara alel HLA-A*24:02 dan HLA-A*24:02 dengan HLA-A*02:01

Perbandingan hasil prediksi epitop antara alel HLA-A*24:02 dan HLA-A*24:07 dengan HLA-A*02:01 menunjukkan ketidakidentikan epitop yang signifikan, terkait kompleksitas variasi alel dalam merespon protein selubung DENV. Tidak ditemukan epitop yang sama persis di antara HLA-A*24:02 dan HLA-A*24:07 dengan HLA-A*02:01, menunjukkan variasi interaksi yang kompleks antara peptida dan alel yang berbeda.

Menariknya, Pada Tabel 2 teramati beberapa epitop yang identik pada HLA-A24:02 dan HLA-A24:07, menunjukkan potensi pengembangan epitop universal yang dapat melibatkan kedua alel tersebut. Hasil ini memberikan landasan untuk pertimbangan lebih lanjut dalam pemilihan epitop sebagai kandidat vaksin universal untuk berbagai serotipe dengue yang beredar di Indonesia. Pengidentifikasian epitop yang konsisten pada alel dominan ini dapat menjadi

langkah strategis dalam mengatasi kompleksitas antigenitas virus dengue di wilayah ini, berpotensi meningkatkan respons imun secara luas dan efektif. Dengan demikian, penelitian ini memberikan wawasan krusial dalam perancangan vaksin dengue yang dapat merespons secara holistik terhadap variasi genetik virus (Ahmed *et al.* 2020; Hou *et al.* 2020). Selain itu dalam penelitian ini, dua peptida yang sebelumnya belum pernah dilaporkan dalam literatur ilmiah berhasil diidentifikasi, yakni peptida SIGGVFTSV yang terkait dengan alel HLA-A*02:01, serta peptida SWFKKGSSI yang terkait dengan alel HLA-A*24:02 dan HLA-A*24:07 (IEDB 2024). Temuan ini memberikan kontribusi penting terhadap pemahaman terkait variasi peptida dan potensi peran fungsionalnya dalam konteks sistem biologis.

Pada tahap membuktikan konsep, beberapa penelitian terdahulu telah memberikan bukti kuat terkait fungsionalitas epitop yang dihasilkan melalui penyaringan imunoinformatika. Sebuah studi yang dilakukan oleh Fadaka *et al.* (2021) menggunakan pendekatan imunoinformatika untuk merancang sebuah kandidat vaksin berbasis epitop terhadap virus dengue. Mereka memprediksi epitop sel B dan sel T dari urutan protein dengue menggunakan server BCPreds dan IEDB dilanjutkan dengan pemilihan epitop berdasarkan kriteria konservasi, antigenisitas, non-toksitas, dan non-alergenitas. Mereka juga melakukan docking molekuler untuk mengevaluasi interaksi epitop terpilih dengan dengan receptor TLR 2, TLR 4, MHC I, dan MHC II. Melalui serangkaian analisis tersebut ditemukan bahwa epitop DENV-1 memiliki energi ikat terbaik serta dapat memicu respon imun spesifik terhadap virus dengue. Mereka juga melakukan optimasi kodon, kloning in silico, simulasi imun in silico, dan simulasi dinamika molekuler untuk memverifikasi ekspresi, efisiensi, dan stabilitas kandidat vaksin. Demikian pula penelitian yang dilakukan oleh Kaushik *et al.* (2022) yang menggunakan imunoinformatika untuk merancang dan memvalidasi in vivo sebuah vaksin multi-epitop berbasis peptida yang dapat bereaksi silang dengan keempat serotipe virus dengue. Prediksi dilakukan pada 10 peptida epitop dari poliprotein empat serotipe dengue yang berikatan dengan MHC II dan menginduksi interferon. Mereka merumuskan vaksin dengan menggunakan peptida epitop, adjuvan dan linker yang sesuai. Docking molekuler dan simulasi dinamika molekuler juga dilakukan untuk memprediksi interaksi yang stabil antara kandidat vaksin dengan TLR 5. Selanjutnya, sintesis dari salah satu epitop diuji pada model kelinci untuk memvalidasi antigenisitas dan kemampuan produksi antibodi. Hasilnya menunjukkan bahwa vaksin yang dirancang memiliki imunogenisitas yang baik dan dapat merangsang produksi antibodi.

Penelitian - penelitian sebelumnya telah konsisten menunjukkan bahwa hasil dari metode

imunoinformatika dapat diandalkan, efektif dan memiliki potensi dalam pengembangan vaksin peptida. Oleh karena itu, pada konteks penelitian ini, langkah selanjutnya untuk membuktikan konsep ini mungkin melibatkan analisis interaksi molekuler tiga dimensi antara kandidat epitop yang dihasilkan dengan alelnya masing - masing, sehingga memberikan pemahaman yang lebih mendalam tentang potensi fungsionalitasnya. Meskipun penelitian ini memberikan kontribusi signifikan dalam upaya perancangan vaksin peptida dengue, ada beberapa limitasi dalam penelitian ini yaitu hanya menggunakan pendekatan imunoinformatika untuk memprediksi peptida epitop, tanpa melakukan prediksi interaksi struktur tiga dimensi epitop dengan alel serta validasi in vitro (Ballester & Mitchell, 2010; Wang 2014). Oleh karena itu, peptida epitop yang dipilih mungkin tidak memiliki antigenisitas, imunogenisitas, atau efikasi yang diharapkan. Selain itu, penelitian ini hanya mempertimbangkan tiga alel dari HLA-A sehingga dapat dilanjutkan dengan memprediksi pada alel lainnya.

KESIMPULAN

Penelitian ini telah berhasil mengidentifikasi kandidat epitop potensial dari protein selubung DENV serotipe 1-4 melalui pendekatan imunoinformatika yang difokuskan pada variasi respon imun virus terhadap alel HLA-A*02:01, HLA-A*24:02, dan HLA-A*24:07. Didapatkan sebanyak 20 peptida terpilih, termasuk 10/20 yang bersesuaian dengan HLA-A*02:01, serta 4/17 dan 6/17 yang berikatan dengan HLA-A*24:02 dan HLA-A*24:07 secara berurutan.

DAFTAR PUSTAKA

- Ahmed, S.F., Quadeer, A.A., Barton, J.P. & McKay, M.R. (2020). Cross-serotypically conserved epitope recommendations for a universal T cell-based dengue vaccine. *PLoS neglected tropical diseases*. **14**(9): e0008676.
- Ali, M., Pandey, R.K., Khatoun, N., Narula, A., Mishra, A. & Prajapati, V.K. (2017). Exploring dengue genome to construct a multi-epitope based subunit vaccine by utilizing immunoinformatics approach to battle against dengue infection. *Scientific Reports*. **7**(1): 9232.
- Alzohairy, A.M. (2011). BioEdit: An important software for molecular biology. *GERF Bulletin of Biosciences, Green Earth Research Foundation*. **2**(1): 60-61,
- Ballester, P.J. & Mitchell, J.B. (2010). A machine learning approach to predicting protein-ligand binding affinity with applications to molecular docking. *Bioinformatics*. **26**(9): 1169-1175.
- Biswas, S., Manna, S., Nandy, A. & Basak, S.C. (2021). New computational approach for peptide vaccine design against SARS-COV-2. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*. **27**: 2257-2273.
- BPOM. (2017). Penjelasan Badan POM RI Terkait Isu Keamanan Vaksin Dengue (Demam Berdarah).
- BPOM. (2022). Persetujuan Izin Edar Vaksin Dengue (Qdenga) untuk Usia 6–45 Tahun.
- Carrington, L.B. & Simmons, C.P. (2014). Human to mosquito transmission of dengue viruses. *Frontiers in Immunology*. **5**: 290.
- Dimitrov, I., Bangov, I., Flower, D.R. & Doytchinova, I. (2014). AllerTOP v. 2—a server for in silico prediction of allergens. *Journal of Molecular Modeling*. **20**: 1-6.
- Doytchinova, I.A. & Flower, D.R. (2007). VaxiJen: a server for prediction of protective antigens, tumour antigens and subunit vaccines. *BMC Bioinformatics*. **8**(1): 1-7.
- ECDC. 2022. Dengue worldwide overview. <https://www.ecdc.europa.eu/en/dengue-monthly>.
- Fadaka, A.O., Sibuyi, N.R.S., Martin, D.R., Goboza, M., Klein, A., Madiehe, A.M. & Meyer, M. (2021). Immunoinformatics design of a novel epitope-based vaccine candidate against dengue virus. *Scientific Reports*. **11**(1): 19707.
- Gupta, L.R., Kalra, U. Shaikh, A.R., Cavallo, L. & Chawla, M. (2022). Immunoinformatics aided design and in-vivo validation of a cross-reactive peptide based multi-epitope vaccine targeting multiple serotypes of dengue virus. *Frontiers in Immunology*. **13**: 865180.
- Gupta, S., Kapoor, P., Chaudhary, K., Gautam, A. & Kumar, R., OpenSource Drug Discovery Consortiu. & Raghava, G. P. (2013). In silico approach for predicting toxicity of peptides and proteins. *PloS one*. **8**(9): e73957.
- Gupta, S., Kapoor, P., Chaudhary, K., Gautam, A., Kumar, R. & Raghava, G.P. (2015). Peptide toxicity prediction. *Computational Peptidology*. **1268**: 143-157.
- Gustiananda, M., Sulisty, B.P., Agustriawan, D. & Andarini, S. (2021). Immunoinformatics analysis of SARS-CoV-2 ORF1ab polyproteins to identify promiscuous and highly conserved T-cell epitopes to formulate vaccine for Indonesia and the world population. *Vaccines*. **9**(12): 1459.
- Hasan, A., Hossain, M. & Alam, J. (2013). A computational assay to design an epitope-based Peptide vaccine against Saint Louis encephalitis virus. *Bioinformatics and Biology Insights*. **7**: BBI-S13402.
- Hertanto, Y.J. & Novita, B.D. (2021). Efficacy of live attenuated dengue vaccines: CYD-TDV; TDV (TAK-003) and TV003/TV005. *Folia Medica Indonesiana*. **57**(4): 365-371.
- Hou, J., Shrivastava, S., Loo, H.L., Wong, L.H., Ooi, E.E. & Chen, J. (2020). Sequential immunization induces strong and broad immunity against all four dengue virus serotypes. *Npj Vaccines*. **5**(1): 1-11.

- Immune Epitope Database & Tools (IEDB). (2024). <https://www.iedb.org/>
- Imusyn. (2023). HLA-A*02:01 [WWW Document]. <https://www.imusyn.de/hla-shop/hla-class-i/hla-a0201/>
- Khairkhah, N., Aghasadeghi, M.R., Namvar, A. & Bolhassani, A. (2020). Design of novel multiepitope constructs-based peptide vaccine against the structural S, N and M proteins of human COVID-19 using immunoinformatics analysis. *Plos One*. **15(10)**: e0240577.
- Khan, A.M., Miotto, O., Heiny, A.T., Salmon, J., Srinivasan, K.N., Nascimento, E., Marques, E.T., Brusic, V. & August, J.T. (2006). A systematic bioinformatics approach for selection of epitope-based vaccine targets. *Cellular Immunology*. **244(2)**: 141-147.
- Nanaware, N., Banerjee, A., Mullick Bagchi, S., Bagchi, P. & Mukherjee, A. (2021). Dengue virus infection: a tale of viral exploitations and host responses. *Viruses*. **13(10)**: 1967.
- Naveed, M., Sheraz, M., Amin, A., Waseem, M., Aziz, T., Khan, A.A., Ghani, M., Shahzad, M., Alruways, M.W., Dabool, A.S., Elazzazy, A.M., Almalki, A.A., Alamri, A.S. & Alhomrani, M. (2022). Designing a novel peptide-based multi-epitope vaccine to evoke a robust immune response against pathogenic multidrug-resistant *Providencia heimbachae*. *Vaccines*. **10(8)**: 1300.
- Nguyen, M.N., Krutz, N.L., Limvipuvadh, V., Lopata, A.L., Gerberick, G.F. & Maurer-Stroh, S. (2022). AllerCatPro 2.0: a web server for predicting protein allergenicity potential. *Nucleic Acids Research*. **50(W1)**: W36-W43.
- Pradana, K.A., Widjaya, M.A. & Wahjudi, M. (2020). Indonesians Human Leukocyte Antigen (HLA) distributions and correlations with global diseases. *Immunological Investigations*. **49(3)**: 333-363.
- Reginald, K., Chan, Y., Plebanski, M. & Poh, C. L. (2018). Development of peptide vaccines in dengue. *Current Pharmaceutical Design*. **24(11)**: 1157-1173.
- Reynisson, B., Alvarez, B., Paul, S., Peters, B. & Nielsen, M. (2020). NetMHCpan-4.1 and NetMHCIIpan-4.0: improved predictions of MHC antigen presentation by concurrent motif deconvolution and integration of MS MHC eluted ligand data. *Nucleic Acids Research*. **48(W1)**: W449-W454.
- Subroto, T., Hardianto, A., Kahari, A.A. & Pradnjaparamita, T. (2013). Sintesis Tiga Peptida Bergugus Pelindung sebagai Prekursor Komponen Vaksin Influenza Universal. *Jurnal Natur Indonesia*. **15(2)**: 84-91.
- Tambunan, U.S.F., Sipahutar, F.R.P., Parikesit, A.A. & Kerami, D. (2016). Vaccine design for H5N1 based on B-and T-cell epitope predictions. *Bioinformatics and Biology Insights*. **10**: BBI-S38378.
- Taupiqurrohman, O., Yusuf, M., Nuswantara, S. & Subroto, T. (2016). Perancangan vaksin virus papilloma manusia tipe-16 berbasis epitop dengan berbantuan imunoinformatika. *Jurnal Pendidikan Kimia*. **8(3)**: 178-182.
- Utama, I.M.S., Lukman, N., Sukmawati, D.D., Alisjahbana, B., Alam, A., Murniati, D., Made Gede Dwi Lingga Utama, I., Puspitasari, D., Kosasih, H., Laksono, I., Karyana, M., Karyanti, M.R., Hapsari, M.M.D.E.A.H., Meutia, N., Jason Liang, C., Wulan, W.N., Lau, C.Y. & Parwati, K.T.M. (2019). Dengue viral infection in Indonesia: Epidemiology, diagnostic challenges, and mutations from an observational cohort study. *PLOS Neglected Tropical Diseases*. **13(10)**: e0007785.
- Wang, J. (2014). Molecular Dynamics Simulations of a Protein Crystal. *Bioenergetics*. **2(e117)**: 1-2.