

PENGEMBANGAN TEKNOLOGI PEMBUATAN VAKSIN PROTEIN REKOMBINAN ENVELOP DARI SIMIAN RETROVIRUS TIPE D SEROTIPE 2 (SRV-2)

Joko Pamungkas¹⁾, Diah Iskandriati, Uus Saepuloh, Rachmitasari Noviana

Penelitian Pendahuluan yang telah kami lakukan membuktikan bahwa angka prevalensi antibodi SRV-2 pada *Macaca fascicularis* dan *M.nemestrina* di Indonesia mencapai 30-40%. Cukup tingginya angka prevalensi tersebut dirasakan akan menghambat proses pemilihan bibit induk (*breeders*) dalam program penangkaran satwa primata bebas SRV. Mengingat potensi infeksi aktif atau laten dan abnormalitas kekebalan yang terkait pada infeksi ini, maka SRV-2 merupakan salah satu target patogen yang harus dieliminasi dalam program penangkaran satwa primata genus *Macaca* bebas patogen tertentu (*specific pathogen free*, SPF). Keadaan tersebut memberikan motivasi kepada kami untuk melanjutkan penelitian kepada kegiatan pengembangan vaksin protein rekombinan bagian envelop dari SRV-2. Imunisasi satwa terhadap SRV-2 menggunakan vaksin protein rekombinan ini diharapkan akan membantu peningkatan perolehan bibit induk dalam penangkaran satwa primata bebas SRV. Kegiatan penelitian ini dilaksanakan selama tiga tahun yang dibagi ke dalam tiga tahapan penelitian yaitu kegiatan penelitian tahun pertama, kedua dan ketiga.

Kegiatan penelitian tahun pertama difokuskan pada konstruksi bakal vaksin protein rekombinan envelop SRV-2 menggunakan vector baculovirus. Pada tahap ini telah dilakukan isolasi dan aplikasi gen target envelop SRV-2 dari *M.fascicularis* asal Indonesia. Amplifikasi dengan teknik PCR dilakukan setelah terlebih dahulu didesain primer spesifik SRV-2 BacNTerm 5823U dan SRV-2 LTR90L22 yang bisa mengaplikasikan daerah envelop SRV-2. Selanjutnya dilakukan kloning terhadap vektor pENTR/Direction/TOPO yang akan memperantarai masuknya gen target ke dalam vector baculovirus. Hasil analisis terhadap plasmid pENTR/D/TOPO menggunakan teknik sekuensing dengan primer spesifik yang dilanjutkan dengan analisis menggunakan program BLAST menunjukkan arah dan urutan nukleotida yang diinginkan dari target gen envelop SRV-2.

Rekombinasi terhadap genom baculovirus dilakukan menggunakan *Baculo Direct baculovirus expression system* dengan enzim LR clonase. Rekombinan selanjutnya ditransfeksikan ke sel line *Spodoptera frugiperda* (Sf 9) menggunakan metode lipid-kationik. Hasil analisis terhadap adanya rekombinasi antara genom baculovirus dengan envelop SRV-2 terhadap stok virus pasase ke-tiga (P3) yang dilakukan dengan teknik PCR dan sekuensing telah menunjukkan hasil yang diharapkan. Untuk melihat adanya ekspresi protein envelop SRV-2, dilakukan dengan teknik elektroforesis SDS-PAGE dan teknik Western blot yang menunjukkan adanya pita spesifik untuk envelop Gp70 SRV-2 meskipun masih ditemukan adanya pita-pita protein non spesifik. Kegiatan penelitian tahun kedua difokuskan pada aplikasi bakal vaksin protein rekombinan envelop SRV-2 terhadap mencit *Balb/c*. Aktivitas antigenik dan imunogenik dari bakal vaksin tersebut dianalisis dengan uji ELISA dan western blot. Tahapan penelitian yang telah dilakukan pada tahun kedua ini adalah

1) Staf Pusat Studi Satwa Primata, LPPM IPB

perbanyakkan terhadap stok virus P3. Analisis terhadap adanya rekombinan gen envelop SRV-2 dilakukan dengan teknik PCR menggunakan primer spesifik *polyhedrin forward* terhadap sekuens spesifik envelop SRV-2 yaitu 5974L dan 6243L yang menghasilkan pita DNA spesifik berukuran 300 dan 600 bp. Hasil ekspresi protein envelop SRV-2 oleh promoter polyhedron yang dianalisis dengan teknik SDS-PAGE menunjukkan adanya pita protein spesifik sekitar 70 kD yang sejajar dengan pita protein dengan teknik Western blot dari protein rekombinan envelop SRV-2 terhadap serum antibodi positif SRV-2 menunjukkan adanya pita spesifik untuk envelop gp70 SRV-2.

Pemurnian terhadap protein rekombinan envelop SRV-2 dari protein-protein sampingan yang tidak diharapkan, dilakukan dengan teknik kromatografi filtrasi gel sepharose Cl-4B dan kromatografi afinitas Ni²⁺-NTA yang akan mengikat 6x His-tag yang berbeda pada system ekspresi baculovirus sehingga dihasilkan hasil elusi berupa protein rekombinan yang diinginkan yaitu protein envelop SRV-2.

Aktivitas antigenik dan imunogenik dari bakal vaksin protein rekombinan envelop SRV-2 dilakukan dengan mengimunisasikannya terhadap mencit *Balb/c*. Empat kelompok mencit (n=6) masing-masing mendapat perlakuan sebagai berikut : 1) imunisasi dengan protein rekombinan hasil pemurnian sepharose Cl-4B, 2) imunisasi dengan protein rekombinan hasil pemurnian sepharose Ni²⁺-NTA, 3) control adjuvant, 4) kontrol plasebo. Analisis terhadap titer serta profil antibodi yang ditimbulkannya dilakukan dengan teknik ELISA. Diperoleh data adanya kenaikan titer antibodi yang cukup signifikan pada kelompok yang diberi perlakuan bakal vaksin protein rekombinan envelop SRV-2 (kelompok I dan II) dibanding kontrol (kelompok III dan IV) yang ditunjukkan oleh nilai *optical density* dari hasil uji ELISA.

Kegiatan penelitian yang telah dilakukan pada tahun ketiga difokuskan pada aplikasi bakal vaksin protein rekombinan envelop SRV-2 terhadap *M.fascicularis*. Aktivitas antigenik dan imunogenik dari bakal vaksin tersebut dianalisis dengan uji ELISA dan western bolt. Tahapan penelitian yang telah dilakukan pada tahun ketiga ini adalah perbanyakkan terhadap stok virus P3, analisis terhadap adanya rekombinan gen envelop SRV-2 dengan teknik PCR, analisis hasil ekspresi protein envelop SRV-2 dengan teknik SDS-PAGE dan western blot. Pemurnian terhadap protein rekombinan envelop SRV-2 dari protein-protein sampingan yang tidak diharapkan, dilakukan dengan teknik kromatografi filtrasi gel sepharose Cl-4B dan kromatografi finites Ni²⁺-NTA.

Aktivitas antigenik dan imunogenik dari bakal vaksin protein rekombinan envelop SRV-2 dilakukan dengan mengimunisasikannya terhadap *M.fascicularis*. Empat kelompok *M.fascicularis* (n=2) masing-masing mendapat perlakuan sebagai berikut : 1) imunisasi dengan protein rekombinan hasil pemurnian sepharose Cl-4B, 2) imunisasi dengan protein rekombinan hasil pemurnian Ni²⁺-NTA, 3) kontrol adjuvant, 4) kontrol plasebo. Analisis terhadap titer serta profil antibodi yang ditimbulkannya dilakukan dengan teknik ELISA. Dari hasil analisis nilai *optimal density* diperoleh data bahwa secara umum terjadi kenaikan nilai OD pada kelompok yang diimunisasi protein rekombinan envelop SRV-2 (kelompok I dan II) dibanding kelompok kontrol adjuvat (kelompok III) dan kelompok kontrol plasebo (kelompok IV).