

KLONING DAN KARAKTERISASI GEN HA1 VIRUS AVIAN INFLUENZA (AI) SUBTYPE H5N1 ISOLAT LOKAL UNTUK PEMEUATAN VAKSIN SUBUNIT

Rosmelati S, Anieka Rohmah, Dyah Estikoma, Endhang P., Sapto Rini, Indah Mukti, Harry Besar S

PUSVETMA, Surabaya, Indonesia

Kata kunci : virus avian *influenza* (AI), H5N1, kloning, gen HA1, vaksin rekombinan

Pendahuluan

Pencegahan penyebaran virus AI ditekankan pada biosekuriti dan perbaikan manajemen kandang, pengembangan perangkat diagnostik cepat (Lau *et al.*, 2004), dan pengembangan produksi vaksin (Lipatov *et al.*, 2004). Vaksin yang beredar di Indonesia adalah vaksin inaktif. Ada beberapa kelemahan yang dimiliki oleh vaksin inaktif yaitu membutuhkan telur ayam bertunas dalam jumlah besar (Johansson *et al.*, 1999); fasilitas BSL 3 (*biosafety level* 3); dan kesulitan memperoleh panen virus dalam jumlah banyak dari telur ayam bertunas (Lipatov *et al.*, 2004). Panen total protein virus dari telur ayam bertunas umur 10 hari sekitar 20-40 mg/200 telur sehingga preparasi vaksin inaktif dalam skala besar dengan metoda ini tidak mungkin dikerjakan dengan mudah (Johansson *et al.*, 1989). Vaksin rekombinan yang berasal dari rekombinan HA dan NA dapat digunakan sebagai alternatif (Babai *et al.*, 1999; Crawford *et al.*, 1999; Johansson *et al.*, 1999). Preparasi vaksin rekombinan lebih aman dan simpel dibandingkan dengan vaksin inaktif (Treanor *et al.*, 2001).

Hasil analisis molekuler genom virus Avian Influenza H5N1 di Indonesia menunjukkan bahwa homologi urutan nukleotida HA dari isolat virus yang berasal dari beberapa daerah di Indonesia yaitu lebih dari 96% (terendah 96,3% dan tertinggi 99,7%). Berdasarkan analisis filogenetik virus AI Indonesia membentuk kelompok yang berbeda dengan virus di yang terdapat di negara lain (Nidom, 2005). Jumlah epitop yang dimiliki isolat Indonesia mempunyai jumlah antara 38 sampai 40 buah (Nidom, 2005). Jumlah epitop ini cukup untuk menimbulkan respon imun sehingga dapat digunakan sebagai seed vaksin untuk menekan gejala klinis yang terjadi akibat infeksi virus ini (Tamura dan Kurata, 2004; Kodihalli *et al.*, 1997).

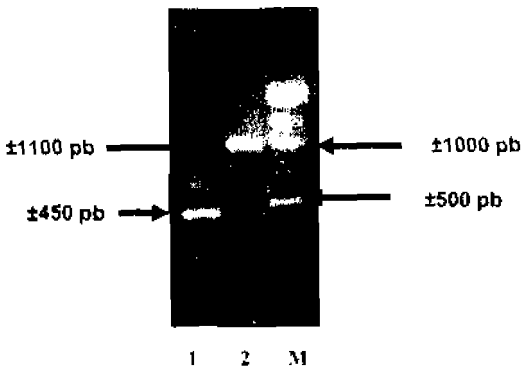
Bahan dan Metode

Tahap penelitian meliputi ekstraksi dan amplifikasi gen HA1 dan kloning dan purifikasi protein rekombinan HA1. Amplifikasi gen HA1 dilakukan dengan menggunakan primer RSAI-1 (sense) dan RSAI-2 (anti *sense*). Primer ini menghasilkan fragmen elektroforesis agarose pada posisi ± 1100 pb. Produk PCR yang telah dipurifikasi dikloning dengan vektor pET101ID-TOPO sehingga dihasilkan DNA plasmid rekombinan yang akan ditransformasi pada hospes *E.coli* TOP10 untuk propagasi dan maintenance dari plasmid rekombinan. Ekspresi protein rekombinan HA1 dilakukan dalam hospes *E.coli* BL-21 star Protein rekombinan yang diperoleh dianalisis dengan SDS PAGE dan *Western Blotting*.

Hasil dan Pembahasan

Telah dilakukan identifikasi virus avian influenza H5N1 isolat Pare dengan metoda *one-step reverse-transcription* PCR. Pasangan primer yang digunakan adalah H5N1FIR yang mengamplifikasi regio HA yang menghasilkan ± 450 pb seperti yang dapat dilihat pada Gambar 1 (Siturneang *et al.*, 2007).

Identifikasi gen HA1 dilakukan dengan menggunakan pasangan primer HA1FIR. Identifikasi virus ini menghasilkan fragmen DNA pada posisi ± 1100 pb seperti yang dapat dilihat pada Gambar 1. Gen HA1 inilah yang nantinya akan digunakan dalam proses kloning.



Gambar 1. Hasil elektroforesis identifikasi dan amplifikasi gen HA1 virus AI H5N1: 1: Identifikasi Virus AI H5N1 isolat lokal; 2: Amplifikasi gen HA1 virus AI H5N1 isolat lokal; M: Marker $\times 774$ RF DNA /Hae III fragments.

Gen hemagglutinin (HA) mengalami translasi menjadi protein HA yang berfungsi sebagai glikoprotein permukaan. Glikoprotein ini berfungsi sebagai *receptor-binding* dan membrane *fusion glycoprotein* (Nwe, 2006). Protein hemagglutinin disusun oleh 568 asam amino dengan berat molekul 56 kDA. Molekul HA terdiri dari subunit HA1 dan subunit HA2. Protein subunit HA1 berperan dalam mediator kontak awal dengan membran sel dan protein subunit HA2 bertanggung jawab terhadap fusi membran. Protein HA1 mempunyai berat molekul 45 kDA. Hasil penelitian Nwe et al., (2006), menunjukkan bahwa protein HA1 potensial digunakan sebagai antigen untuk

bahan vaksin rekombinan dan bahan tes diagnostik untuk virus AI sub tipe H5.

Kesimpulan

Kloning gen HA1 virus AI sub tipe H5N1 isolat Indonesia digunakan untuk mendapatkan protein rekombinan HA1 dalam jumlah besar, yang nantinya digunakan sebagai bahan vaksin rekombinan AI dalam rangka pencegahan dan penanggulangan serta pengendalian penyakit AI di Indonesia.

Daftar Pustaka

- Babai I, Samira S, Barenholz Y, Zakay-Rones Z, Kedar E: A novel influenza subunit vaccine composed of liposome-encapsulated haemagglutinin/neuraminidase and IL-2 or GM-CSF I. Vaccine characterization and efficacy studies in mice. *Vaccine* 1999, 17(9-10):1223-1238.
- Lipatov AS, Govorkova EA, Webby RJ, Ozaki H, Peiris M, Guan Y, Poon L, Webster RG. 2004: Influenza: emergence and control. *J Virol*, 78(17):8951-8959.
- Nidom. C.A. 2005 Analisis Molekuler Genoma Virus Avian Influenza H5N1 di Indonesia. Program Pasca Sarjana Universitas Airlangga.
- Treanor JJ, Wilkinson BE, Maseoud F, Hupprimmer J, Battaglia R, O'Brien D, Wolff M, Rabinovich G, Blackwelder W, Katz JM: Safety and immunogenicity of a recombinant hemagglutinin vaccine for H5 influenza in humans. *Vaccine* 2001, 19(13-14):1732-1737.