

## Kloning Fragmen Gen Non-Struktural 1 (NS1) Virus *Dengue* Subtipe 1 (DENV-1) Sebagai Kandidat Bahan Vaksin *Chimera*

### Cloning Gene Fragments Non-Structural 1 (NS1) of Dengue Virus Subtype 1 (DENV-1) as A Material Candidate of Vaccine Chimera

**<sup>1</sup>Nur Saidah Said, <sup>2</sup>Helen Susilowati, <sup>2</sup>Deya Karsari, <sup>2</sup>Eryk Hendrianto,  
<sup>3</sup>Mufasirin, <sup>3</sup>Fedik Abdul Rantam**

<sup>1</sup> Pascasarjana Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga

<sup>2</sup>Institut Tropical Disease Universitar Airlangga

<sup>3</sup> Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga

Kampuc C Unair, Jl. Mulyorejo Surabaya – 60115

Telp. 031-5992785, Fax. 031-5993014

Email : vetunair@telkom.net

#### Abstract

Dengue infection caused by dengue virus (DENV), which includes family Flaviviridae, which has four serotypes of DENV-1, DENV-2, DENV-3 and DENV-4. Dengue virus has a positive sense RNA genome consisting of three genes encoding structural proteins namely protein C (lipids), the E and M/PRM (glycoprotein) and 7 genes encoding non-structural proteins (NS1, NS2a, NS2b, NS3, NS4a, NS4b and NS5). NS1 protein is a highly conserved glycoprotein that plays an important role in viral replication and maturation, NS1 antigen immunogenicity because it has a high potential, capable of inducing antibodies through binding activity of the complement system. This study aimed to clone and analyze protein NS1 gene encoding the genetic stability of non-structural protein 1 (NS1) of dengue virus subtype 1 (DENV-1) after cloning . The results of this study showed fragments of the gene encoding the NS1 protein of dengue virus subtype 1 (DENV-1) after cloning the DNA plasmid vector (pGEM®-T Easy Vector System) and transformed in *E. coli* JM109 and then performed the verification testing by PCR followed by electrophoresis showed positive results with the invisibility of amplicon fragments NS1 DENV-1 protein coding genes at 435 bp. After sequencing to look at the stability of the gene fragment encoding the DENV-1 NS1 protein after cloning, there are variations in the composition of which is characterized by the presence of nucleotide insertions, deletions, replacements cloned nucleotide composition compared to the original isolate fragments of the gene encoding the NS1 protein of dengue virus serotype 1 at position initial 1-30 and 425 but the arrangement of positions 31-424 and 426-436 nucleotides stabilized.

**Keywords :** dengue NS1 , cloning , genetic stability

---

#### Pendahuluan

Penyakit demam *dengue* dan demam berdarah *dengue* (DBD) merupakan masalah utama kesehatan dunia. Sekitar

2,5 miliar manusia tinggal di zona tropis dan subtropis, sangat rentang terserang infeksi *dengue* (WHO, 2007), antibodi yang ditimbulkan oleh infeksi

virus *dengue* tidak menimbulkan kekebalan silang (*cross immunity* atau *seroprotectype*) sehingga sulit dieliminasi secara alamiah (*natural protection*). Diperlukan pendekatan teknologi yang sesuai dengan ekspektasi dan presisi yang tinggi, sehingga protektif untuk semua serotipe (Sun *et al.*, 2006). Virus *dengue* memiliki genom RNA *positive sense* yang terdiri atas 3 gen pengkode protein struktural yaitu protein C (lipid), protein E dan protein M/prM (glikoprotein) serta 7 gen pengkode protein non-struktural (NS1, NS2a, NS2b, NS3, NS4a, NS4b dan NS5) (Alcon *et al.*, 2002). Infeksi *dengue* dapat menyebabkan manifestasi klinis mulai dari gejala demam *dengue* yang relatif ringan sampai gejala *haemoragic* yang mampu menyebabkan kematian (Young *et al.*, 2000).

Data Kementerian Kesehatan (Kemenkes) Republik Indonesia mencatat jumlah kasus DBD pada tahun 2009 mencapai sekitar 150 ribu. Angka ini cenderung stabil pada tahun 2010, sehingga kasus demam berdarah *dengue* di Indonesia belum bisa dikatakan berkurang. Demikian juga dengan tingkat kematian, tidak banyak berubah dari 0,89% pada tahun 2009 menjadi 0,87% pada tahun 2010. Ini berarti ada sekitar 1.420 korban meninggal akibat DBD pada 2009 dan sekitar 1.317 korban meninggal pada tahun 2010 (Pramudiarja, 2011).

Berdasarkan model vaksin diatas banyak hal yang harus dipertimbangkan sehingga tidak terjadi reaktogenisitas pada resipien. Vaksin yang ideal adalah vaksin yang bahan imunogen harus sesuai dengan agent infeksi dilapangan (*wild type*) yang berarti tingkat homologi dan stabilitas genetik, antigenisitas, imunogenisitas tinggi, tidak terjadi interferensi dari serotipe lain dan mampu mengenali dan dikenali oleh sel TCD4<sup>+</sup>, sel TCD8<sup>+</sup> dan sel B serta dapat menginduksi asesoris *antigen presenting cells* (APC) untuk sekresi sitokin sebagai konduktor dalam komunikasi sel imun (Men *et al.*, 2000).

Protein Non-struktural 1 (NS1) dikode oleh gen NS1. Protein tersebut berpotensi sebagai bahan dasar pengembangan alat diagnostik maupun vaksin *chimera* kombinasi yellow fever virus dengan DENV (Lemes *et al.*, 2005). Protein NS1 merupakan glikoprotein *highly conserved* yang berperan penting dalam replikasi dan maturasi virus (Kumarasamy *et al.*, 2007). Menurut Young *et al.*, (2000), antigen NS1 potensial karena memiliki imunogenitas tinggi, mampu menginduksi antibodi melalui aktivitas pengikatan sistem komplemen dan berada dalam konsentrasi tinggi selama fase klinis awal pada serum penderita yang mengalami infeksi primer maupun sekunder (Alcon *et al.*, 2002).

Kloning gen NS1 dalam sel bakteri *Escherichia coli* merupakan tahap awal dari proyek jangka panjang pengembangan vaksin chimera kombinasi yellow fever virus dengan DENV. Klon rekombinan hasil kloning diharapkan dapat menghasilkan gen rekombinan NS1 virus *dengue* (DEN1) dengan optimal sehingga dapat digunakan sebagai bahan dasar diagnosa penyakit dan vaksin *chimera* kombinasi yellow fever virus dengan DENV. Penentuan *chimera* yang menggunakan gen penyandi protein NS1 didesain sebagai *signaling* melalui sekresi interferon untuk mengaktifkan antibodi seluler sel TCD4<sup>+</sup> dan sel T CD8<sup>+</sup>. Dengan demikian akan terinduksi respons imun yang dapat menetralisir infeksi virus *dengue*.

## Materi dan Metode Penelitian

Penelitian ini menggunakan isolat virus *dengue* yang diperoleh dari Laboratorium *Dengue Infectious Tropical Disease* (ITD) Univeritas Airlangga yang berasal dari sampel pasien *dengue* Rumah Sakit DR. Soetomo Surabaya.

### Ekstraksi RNA

Tahap awal ekstraksi RNA yaitu dengan menambahkan Trizol Reagen sebanyak 1 ml ke dalam *tube* yang berisi

sel, resuspensi/kocok dengan tangan selama 15 detik, selanjutnya diinkubasi selama 5 menit pada suhu ruang. Tambahkan 200  $\mu$ l chloroform, diresuspensi selama 15 detik selanjutnya diinkubasi selama 2-3 menit di suhu ruang. Kemudian disentrifugasi 12.000 rpm 4°C selama 15 menit dan supernatan yang berwarna jernih dipindahkan ke dalam tube baru serta tambahkan isopropyl alkohol sebanyak 500  $\mu$ l selanjutnya diresuspensi selama 15 detik dan diinkubasi selama 10 menit di suhu ruang. Tahap selanjutnya disentrifugasi selama 12.000 rpm 4 °C selama 10 menit dan buang supernatan. Pellet di cuci dengan 1 ml ethanol 75%. Selanjutnya di vortex dan disentrifugasi 7.500 rpm 4 °C selama 5 menit, RNA di keringkan selama 5-10 menit dan ditambahkan RNase Free Water 10-20  $\mu$ l dan disimpan pada suhu -80 °C.

#### Amplifikasi gen NS1 *dengue* dengan PCR

Reaksi RT-PCR diawali dengan pencampuran komponen (RNA primer) ; mix primer (TS1-TS4 @ 10  $\mu$ M) 1  $\mu$ l, 1  $\mu$ l RNA, 2  $\mu$ l dNTPmix (10 mM) dan 8  $\mu$ l DEPC, kemudian diinkubasi pada suhu 65 °C selama 5 menit. Selanjutnya dilakukan pencampuran komponen (*master reaction mix*) ; 4  $\mu$ l 5x cDNA synthesis buffer, 1  $\mu$ l DTT (0,1 M), 0,5  $\mu$ l Rnase OUT, 2  $\mu$ l DEPC dan 0,5  $\mu$ l thermo script RT. 8  $\mu$ l *master reaction* dicampurkan kedalam campuran RNA primer dan diinkubasi selama 45 menit pada suhu 50 °C kemudian dinkubasi pada suhu 85 °C selama 5 menit. satu  $\mu$ l RNase H ditambahkan dan diinkubasi pada suhu 37 °C selama 20 menit. cDNA disimpan pada suhu -30 °C.

Reaksi PCR diawali dengan pencampuran komponen (*master mix* (untuk 5 sampel)); 79,5  $\mu$ l autoclaved distilled water, 10  $\mu$ l 10x PCR buffer minus Mg, 3  $\mu$ l MgCl<sub>2</sub> (50 mM), 2  $\mu$ l dNTP mixture (10 mM),

5  $\mu$ l mix primer (D1, TS1, TS2, TS3, TS4) dan 0,5  $\mu$ l Tag DNA polymerase. Dua puluh  $\mu$ l *master mix* dimasukkan ke dalam tiap tabung PCR yang berisi 1  $\mu$ l cDNA kemudian disentrifugasi. Siklus PCR sebanyak 30 kali dimulai dengan denaturasi awal pada suhu 94 °C selama 4 menit dan denaturasi akhir pada suhu 94°C selama 1 menit, annealing pada suhu 50°C selama 1 menit dan polimerasi awal pada suhu 72°C selama 2 menit. Siklus PCR diakhiri dengan polimerisasi akhir pada suhu 72°C selama 10 menit dan penurunan suhu inkubasi menjadi 4°C. hasil reaksi PCR dianalisis dengan elektroforesis gel agarosa 1,5% (150 V, 60 menit). Pita DNA yang jelas dan pada ukuran yang tepat pada gel agarosa dianggap sebagai hasil yang positif dan dipurifikasi. Sementara pita DNA yang kurang jelas pada gel agarosa tapi berada pada ukuran yang tepat, mesti dipertimbangkan lebih lanjut karena dianggap sebagai hasil yang tidak jelas (Massi dan Sabran, 2007).

#### Restriksi

Digesti plasmid diawali dengan pencampuran komponen ; 16  $\mu$ l NFW, 2  $\mu$ l 10x *buffer EcoRI*, 1  $\mu$ l plasmid DNA pGEM®-T Easy Vector System (Promega) dan 1  $\mu$ l enzim *EcoRI* (Fermentas). Komponen dicampurkan dengan produk PCR NS1 ke dalam mikrotube kemudian vortex selama 2 menit. Kemudian diinkubasi pada suhu 37 °C selama 16 jam (dalam waterbath) selanjutnya diaktivasi pada suhu 65 °C selama 20 menit (dalam waterbath). Hasil reaksi digesti langsung dianalisis dengan elektroforesis gel agarosa 1,5% (150 volt selama 60 menit).

#### Ligasi vektor pGEM®-T Easy Vector System (Promega) dengan gen NS1 *dengue*

Ligasi plasmid pGEM®-T Easy Vector System (Promega) dengan sisipan

gen NS1 *dengue* menggunakan enzim T4 DNA ligase (Promega). Reaksi ligasi terdiri atas 1  $\mu$ l 10x T4 DNA ligation buffer, 1  $\mu$ l DNA plasmid pGEM<sup>®</sup>-T Easy Vector, 6  $\mu$ l gen NS1 *dengue* yang telah di digesti, 3 unit T4 DNA Ligase (3 unit/ $\mu$ l), serta 1  $\mu$ l ddH<sub>2</sub>O (*dionised water*). Reaksi ligasi diinkubasi pada suhu 4 °C selama semalam (*overnight*).

Kontrol positif ligasi terdiri atas 1  $\mu$ l 10x T4 DNA ligation buffer, 1  $\mu$ l DNA plasmid pGEM<sup>®</sup>-T Easy Vector, 2  $\mu$ l Control Insert DNA, 3 unit T4 DNA Ligase (3 unit/ $\mu$ l) serta 5  $\mu$ l ddH<sub>2</sub>O (*dionised water*). Kontrol negatif ligasi terdiri atas 1  $\mu$ l 10x T4 DNA ligation buffer, 1  $\mu$ l DNA plasmid pGEM<sup>®</sup>-T Easy Vector, 3 unit T4 DNA Ligase (3 unit/ $\mu$ l) serta 7  $\mu$ l ddH<sub>2</sub>O (*dionised water*).

Transformasi dan seleksi kandidat koloni rekombinan

Transformasi DNA plasmid ke dalam sel kompeten *E. coli* diawali dengan: (a) Siapkan dua plate LB yang berisi ampisilin, IPTG 15  $\mu$ l dan X-Gal 7,5  $\mu$ l untuk setiap reaksi ligasi, ditambah dua plate untuk menentukan efisiensi transformasi, (b) Tabung berisi reaksi ligasi di sentrifugasi, 2  $\mu$ l reaksi ligasi dimasukkan ke dalam setiap tabung *microcentrifuge* yang disimpan dalam kotak es, (c) *Thawing* sel kompoten JM109 High Efficiency Competent Cells pada kotak es selama 5 menit kemudian sel dicampur dengan menjentikkan tabung secara lembut, (d) Secara hati-hati 50  $\mu$ l sel ditambahkan ke dalam setiap tabung yang disiapkan pada langkah 2 dan 100  $\mu$ l untuk tabung yang berisi reaksi kontrol, (e) Campur sel dengan menjentikkan tabung secara lembut dan diinkubasi pada kotak es selama 20 menit, (f) Sel di *heat-shock* selama 45-50 detik ke dalam *waterbath* yang telah diatur suhunya menjadi 42°C, (g) Segera tabung diinkubasi ke dalam kotak es selama 2 menit, (h) 950  $\mu$ l media SOC

ditambahkan ke tabung pada suhu ruang yang mengandung sel-sel transfeksi dengan reaksi ligasi dan 900  $\mu$ l ke tabung berisi reaksi kontrol, (i) Tabung diinkubasi pada *incubator shaker* selama 1,5 jam pada suhu 37 °C dengan kecepatan 150 rpm, (j) 100  $\mu$ l ditambahkan pada tiap kultur transformasi ke plate LB yang berisi ampisilin, IPTG 15  $\mu$ l dan X-Gal 7,5  $\mu$ l. Untuk kontrol dilakukan pengenceran 1:10 dengan media SOC, (k) Plate diinkubasi pada suhu 37 °C semalam (*overnight* selama 16-24 jam) kemudian pilih koloni yang berwarna putih.

#### Verifikasi hasil kloning dengan PCR

Plasmid rekombinan yang telah memberikan hasil positif selanjutnya diverifikasi dengan PCR. Reaksi PCR diawali dengan pencampuran komponen (*master mix* (untuk 5 sampel)) ; 79,5  $\mu$ l autoclaved distilled water, 10  $\mu$ l 10x PCR buffer minus Mg, 3  $\mu$ l MgCl<sub>2</sub> (50 mM), 2  $\mu$ l dNTP mixture (10 mM), 5  $\mu$ l mix primer (D1, TS1, TS2, TS3, TS4) dan 0,5  $\mu$ l Tag DNA polymerase. 20  $\mu$ l *master mix* dimasukkan ke dalam tiap tabung PCR yang berisi 1  $\mu$ l DNA cetakan (plasmid rekombinan) kemudian disentrifugasi. Siklus PCR sebanyak 30 kali dimulai dengan denaturasi awal pada suhu 94 °C selama 4 menit dan denaturasi akhir pada suhu 94 °C selama 1 menit, annealing pada suhu 50 °C selama 1 menit dan polimerasi awal pada suhu 72 °C selama 2 menit. Siklus PCR diakhiri dengan polimerisasi akhir pada suhu 72 °C selama 10 menit dan penurunan suhu inkubasi menjadi 4 °C. hasil reaksi PCR dianalisis dengan elektroforesis gel agarosa 1,5% (150 V, 60 menit).

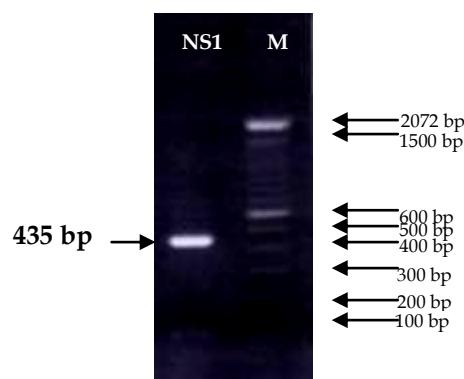
#### Sekuensing DNA

Purifikasi produk PCR dilakukan menggunakan kit: QIAquick PCR Purification kit (QIAGEN) dan QIAquick Gel Purification kit (QIAGEN). Hasil purifikasi selanjutnya dilakukan pelabelan dengan BigDye, kit

yang digunakan adalah ABI PRISM® Big Dye terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit. Sekuensi menggunakan automatic sequencer berdasarkan Sanger (*dideoxy terminator method*). Reaksi ini didasarkan pada bahan yang dilabel dengan fluoresens yang akan memberi perubahan warna yang sesuai setelah melewati sinar laser pada mesin automatic ABI Prism™ 310 Genetic analyser Perkin Elmer.

### Hasil dan Pembahasan

Hasil dari elektroforesis fragmen gen pengkode protein NS1 virus *Dengue* serotype 1 isolat ITD dengan menggunakan gel agarose 1,5% dan DNA ladder sebagai *marker* terlihat pita yang sejajar dengan standar *marker* pada posisi 436 bp.

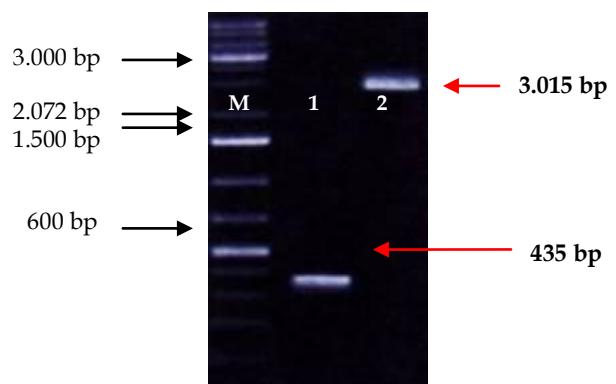


Gambar 1 Hasil elektroforesis DNA fragmen gen pengkode protein NS1 virus *Dengue* serotype 1 isolat ITD pada posisi 435 bp, Keterangan: M=Marker, NS1=protein NS1 DENV-1

Pada proses elektroforesis ini menggunakan primer forward yang mulai menempel pada posisi genom 1-20 (5'-GAC TGG CCG GGA TAC AAG AG-3'), sedangkan primer reverse terakhir menempel pada posisi genom 417-436 (5'-CTG ATA CAA AAC GCA AGT CA-3').

### Restriksi

Gen NS1 dan plasmid pGEM®-T Easy Vector System (Promega) yang telah didigesti dan dipurifikasi dianalisis dengan elektroforesis gel agarosa 1,5% (150 volt selama 60 menit). Hasil yang didapatkan setelah melakukan proses elektroforesis dapat dilihat seperti Gambar 2.



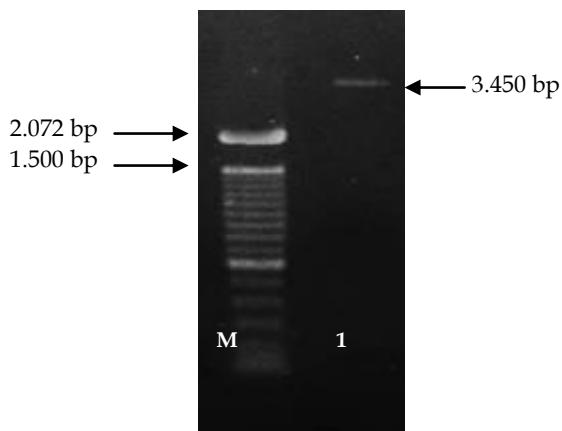
Gambar 2 Elektroforesis hasil DNA fragmen gen pengkode protein NS1 virus serotype 1 isolat ITD hasil PCR serta plasmid DNA pGEM®-T Easy Vector System yang telah didigesti dengan enzim EcoRI.

Keterangan: M=marker, lajur 1=NS1 *dengue* DENV-1, lajur 2=plasmid DNA pGEM®-T Easy Vector System yang telah didigesti dengan enzim EcoRI.

Enzim restriksi EcoRI memotong molekul DNA pada urutan heksa-nukleotida 5'—GAATTC—3' pada posisi antara basa G dan A. Demikian pula pada urutan polindromiknya 3'—CTTAAG—5' enzim EcoRI, juga memotong pada posisi antara basa A dan G, sehingga molekul DNA heliks ganda yang terpotong oleh enzim EcoRI, menghasilkan fragmen restriksi dengan kedia ujung yang lengket (Kurnia, 2011).

### Ligasi Vektor pGEM®-T Easy Vector System dengan Gen NS1

Fragmen gen NS1 *dengue* selanjutnya diligasikan dengan plasmid pGEM®-T Easy Vector System. Ujung-ujung fragmen gen NS1 berlekatan dengan ujung-ujung vektor pGEM®-T Easy Vector System yang berkomplemen. Fragmen gen NS1 *dengue* berukuran 435 bp disisipkan ke dalam vektor plasmid pGEM®-T Easy Vector System berukuran 3.015 bp sehingga menghasilkan plasmid rekombinan berukuran 3.461 bp. Hasil ligasi kemudian dianalisis dengan elektroforesis gel agarosa 1,5% (150 volt selama 60 menit). Hasil yang didapatkan setelah melakukan proses elektroforesis dapat dilihat seperti Gambar 3. Reaksi ligasi dua fragmen DNA tersebut dikatalisis menggunakan T4 DNA ligase. Menurut Cranenburgh (2004), T4 DNA ligase mengkatalisis reaksi pengikatan ujung molekul DNA yang saling berkomplemen.

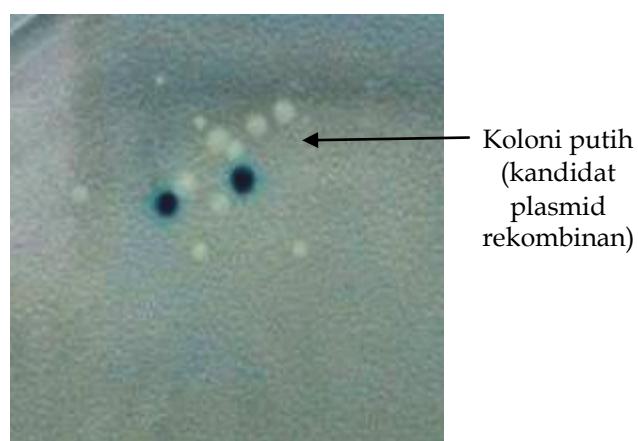


Gambar 3 Elektroforesis DNA hasil Ligasi vektor pGEM®-T Easy Vector System dengan gen NS1, Keterangan: M=marker, lajur 1= Ligasi vektor pGEM®-T Easy Vector System dengan gen NS1.

### Transformasi dan Seleksi Kandidat Koloni Rekombinan

Proses transformasi plasmid dari bagian luar ke dalam sel diinduksi oleh kejutan panas dari suhu 0 °C ke suhu 42°C. Kejutan panas merupakan tahap krusial dalam transformasi. Kemungkinan

molekul DNA asing yang telah menempel pada dinding sel kompeten terintroduksi ke dalam sitoplasma dengan pemberian kejutan panas (Brown, 2006).

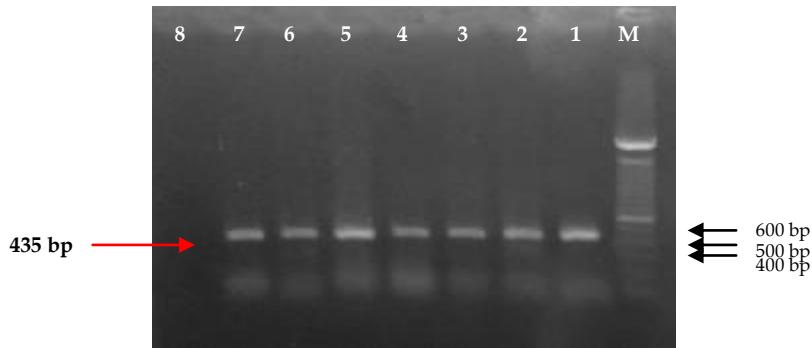


Gambar 4. Hasil reaksi ligasi antara vektor dengan sisipan.

Seleksi dilakukan dengan memilih koloni yang dapat tumbuh pada medium ampisilin dan berhasil mentransformasi plasmid pGEM®-T Easy Vector System. Pada medium seleksi SOB terdapat gen *LacZ* yaitu gen yang mengkode enzim galaktosidase, DNA sisipan akan merusak gen *LacZ* sehingga enzim galaktosidase tidak diproduksi yang akhirnya X-Gal yang terdapat pada medium tidak diuraikan sehingga koloni yang tumbuh berwarna putih. Enzim galaktosidase yang diproduksi menyebabkan X-Gal yang terdapat pada medium terurai sehingga menghasilkan koloni yang berwarna biru (Brown, 2006).

### Verifikasi plasmid rekombinan

Komposisi reaksi dan kondisi PCR yang diprogram sama dengan kondisi PCR sampel gen NS1 *dengue*, diharapkan apabila gen NS1 *dengue* telah berhasil tersisip dengan orientasi tepat pada vektor pGEM®-T Easy Vector System (masing-masing ujung 5' dan 3' kedua fragmen DNA berkomplemen satu sama lain), maka muncul pita DNA gen NS1 *dengue* yang berukuran 435 bp pada gel agarosa hasil elektroforesis Gambar 5.

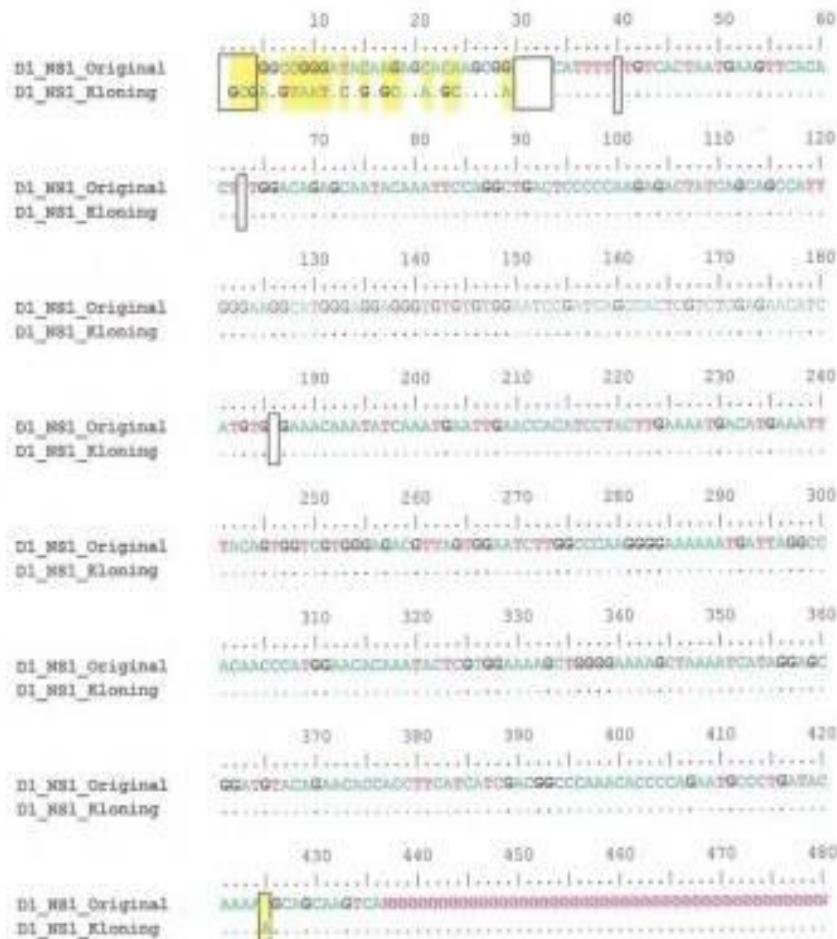


Gambar 5. Hasil elektroforesis verifikasi gen NS1 *dengue* yang telah disisipkan ke dalam vector; keterangan : M= marker, lajur 1-7 = NS1 *dengue* DENV-1 yang telah didigesti dengan enzim EcoRI, lajur 8 = kontrol negatif PCR.

#### *Sequencing* dan analisis stabilitas genetik

Analisis homologi dengan menggunakan program *BioEdit Sequence Alignment Editor Clustal W*, sehingga dapat diketahui urutan genom nukleotida dari fragmen

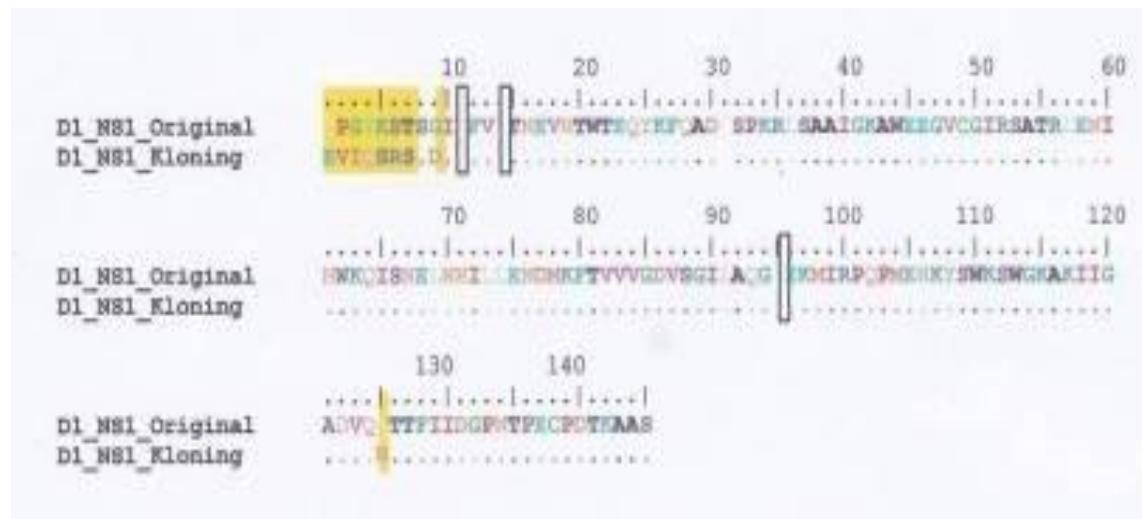
gen pengkode protein NS1 virus DENV-1 isolat ITD setelah dilakukan sekuensing dapat dilihat pada Gambar 6.



Gambar 6. Hasil dari *multiple alignment* posisi nukleotida 1-436. Tanda titik adalah identik dengan paling atas; warna kuning adalah *variable sites*, yaitu daerah yang mengalami perubahan.

Berdasarkan hasil sekruensing dari fragmen gen pengkode protein NS1 virus DENV-1 isolat ITD terdapat variasi nukleotida pada posisi 1-30 awal dan posisi 425 dengan ditandai terdapat penambahan atau insersi dan delesi pada susunan nukleotida. Hasil *sequencing* nukleotida kemudian ditranslasi menjadi asam amino menggunakan bantuan

software MEGA 5 dan diperoleh hasil dari translasi protein dari nukleotida kloning fragmen gen pengkode protein NS1 virus *dengue* subtipe 1 (DENV-1). Satu asam amino dikode oleh 3 nukleotida, sehingga panjang nukleotida 436 nukleotida ketika ditranslasi menjadi 145 asam amino.



Gambar 7. Urutan asam amino hasil translasi protein dari kloning fragmen gen pengkode protein NS1 virus *dengue* subtip 1 (DENV-1), daerah kuning adalah *variable sites*

Tabel 1. Hasil Analisis Asam Amino Menggunakan BLAST

<i>Description</i>	<i>Max score</i>	<i>Total score</i>	<i>Query cover</i>	<i>E value</i>	<i>Ident</i>	<i>Accession</i>
D1_NS1_Cloning	284	284	100%	1e-114	98%	671051

Untuk melihat similaritas sekuen-sekuen antar *blind passage* dengan harapan sekuen-sekuen tersebut merupakan sekuen yang homolog (memiliki kemiripan yang signifikan dalam biologi), analisa dilakukan dengan menggunakan *software BLAST on line* di NCBI. Hasil dari BLAST asam amino NS1 virus *dengue* serotype 1 yang telah dikloning terlihat pada tabel 1.

Hasil penelitian ini menunjukkan tingkat stabilitas tinggi jika dilihat dari

analisis alignment fragmen gen yang menyandi protein nonstruktural (NS1). Adanya varian atau perbedaan nukleotida karena ada mutasi dan delesi di daerah yang kemungkinan hipervariabel. Hal ini ditemukan utamanya didaerah ini dipilih sebagai kandidat bahan pengembangan vaksin chimera. Hal ini menjadi sangat penting karena bahan imunogen jika tingkat homologi tinggi jika dibandingkan dengan penyebab penyakit di lapangan maka

kemampuan netralisasi sangat tinggi pula. Hal lain yang penting dalam mendukung stabilitas adalah kekerabatan virus berdasarkan untaian nukleotida, karena nukleotida yang mengalami mutasi maka protein yang dikode juga mengalami perubahan sifat walaupun masih tergantung dari susunan asam amino dan peptide.

### Kesimpulan

Setelah dilakukan penelitian “Kloning gen Non-struktural 1 (NS1) virus *Dengue* subtipe 1 (DENV-1) sebagai bahan vaksin *chimera*” ini maka dapat disimpulkan sebagaimana berikut ini: uji verifikasi fragmen gen pengkode protein NS1 virus *Dengue* subtipe 1 (DENV-1) setelah dilakukan kloning dengan PCR yang dilanjutkan dengan elektroforesis menunjukkan hasil yang positif dengan terlihatnya amplikon fragmen gen pengkode protein NS1 DENV-1 sebesar 435 bp. Analisa stabilitas fragmen gen pengkode protein NS1 DENV-1 setelah dikloning, terdapat variasi susunan nukleotida yang ditandai dengan adanya insersi, delesi, penggantian susunan nukleotida hasil kloning dibandingkan dengan isolat original fragmen gen pengkode protein NS1 virus *Dengue* serotipe 1 pada posisi 1-30 awal dan 425 tetapi pada posisi 31-424 dan 426-436 susunan nukleotida kembali stabil.

### Daftar Pustaka

Alcon, S., A. Talarmin, M. Debruyne, A. Falconar, V. Deubel and M. Flamand. 2002. Enzyme-linked immunosorbent assay spesific to dengue virus type-1 nonstructural protein NS1 reveals circulation of the antigen in the blood during the acute phase of disease in patients experiencing primary

- or secondary infection. *J. Clin. Mic.* 40: 376-381
- Brown, T.A. 2006. Gene cloning and DNA analysis : An introduction. 5th ed. Blackwell publishing, Oxford. 233
- Kumarasamy, V., A.H. Abdul-Wahab, S.K. Chua, Z. Hassan, Y.K. Chem, M. Mohamad and K.B. Chua. 2007. Evaluation of a commercial dengue NS1 antigen-capture ELISA for laboratory diagnosis of acute dengue virus infection, *Journal of virological methods*: 75-79
- Lemes, E.M.B., M.P. miagostovisch, A.M.B. Alves, S.M. Costa, A.M.B. Fillipis, G.R.G. Armoa and M.A.V. Araujo. 2005. Circulating human antibodies against dengue NS1 protein: Potential of recombinant D2V-NS1 proteins in diagnostic test. *J. Clin. Virology*: 305-312
- Men R., Wyatt I., Tokimatsu I., et al., 2000. Immunization of rhesus monkey with a recombinant of modified vaccinia virus ankara expressing a truncated envelope glycoprotein of dengue type 2 virus induced resistance to dengue virus type 2 challenge. *Vaccine* 18(27): 3113-3122
- Sun W, Nisalak A, Gettayacamin M, et al., 2006. Protection of Rhesus monkeys against dengue virus challenge after tetravalent live attenuated dengue virus vaccination. *J. Infect. Dis.* 193(12):1658-1665.
- WHO (World Health Organization) 2007. Situation update of dengue in the SEA region. [http://www.searo.who.int/linkFiles/Dengue\\_dengueSEAR-07.pdf](http://www.searo.who.int/linkFiles/Dengue_dengueSEAR-07.pdf)
- Young, P.R., P.A. Hilditch, C. Bletchly and W. Halloran. 2000. An

antigen capture enzyme-linked immunosorbent assay reveals high levels of the dengue virus

protein NS1 in the sera of infected patients. J. Clin. Micro. 153-157