

**ANALISIS EKSPRESI PROTEIN REKOMBINAN CHIMERA MULTI-
EPITOPE VP1Me2-Fc SEBAGAI KANDIDAT ANTIGEN VAKSIN HFMD
PADA SISTEM *E.coli* DAN HEK293A**

SKRIPSI

**Oleh:
FARADILA ZAHROTUL NUR AZIZAH
NIM. 220602110090**



**PROGRAM STUDI BIOLOGI
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI MAULANA MALIK IBRAHIM MALANG
2026**

**ANALISIS EKSPRESI PROTEIN REKOMBINAN CHIMERA MULTI-
EPITOPE VP1Me2-Fc SEBAGAI KANDIDAT ANTIGEN VAKSIN HFMD
PADA SISTEM *E.coli* DAN HEK293A**

PROPOSAL SKRIPSI

Oleh:

**FARADILA ZAHROTUL NUR AZIZAH
NIM. 220602110090**

Diajukan Kepada:

**Fakultas Sains dan Teknologi
Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang
Untuk Memenuhi Salah Satu Persyaratan
Dalam Memperoleh Gelar Sarjana Sains (S.Si)**

**PROGRAM STUDI BIOLOGI
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI MAULANA MALIK IBRAHIM
MALANG
2026**

ANALISIS EKSPRESI PROTEIN REKOMBINAN CHIMERA MULTI-EPITOPE VP1Me2-Fc SEBAGAI KANDIDAT ANTIGEN VAKSIN HFMD PADA SISTEM *E.coli* DAN HEK293A

SKRIPSI

Oleh:

**FARADILA ZAHROTUL NUR AZIZAH
NIM. 220602110090**

**telah diperiksa dan disetujui untuk diuji
Tanggal: 2026**

Pembimbing I



**Dr. Kiptiyah, M.Si
NIP. 1973005 200212 2 003**

Pembimbing II



**Dr. M. Mukhlis Fahrudin, M.S.I
NIPPPK: 19821120 2025 211035**

Mengetahui,

Ketua Program Studi Biologi



**Prof. Dr. Retno Susilowati, M.Si
NIP. 19671113 199402 2 001**

HALAMAN PENGESAHAN

Skripsi ini diajukan oleh :

Nama : Faradila Zahrotul Nur Azizah
NIM : 220602110090
Program Studi : Biologi
Judul Skripsi : ANALISIS EKSPRESI PROTEIN REKOMBINAN
CHIMERA MULTI-EPITOPE VP1Me2-Fc SEBAGAI
KANDIDAT ANTIGEN VAKSIN HFMD PADA SISTEM
E.coli DAN HEK293A

Telah berhasil dipertahankan di hadapan Dewan Penguji pada tanggal 15 April 2026 dan diterima sebagai bagian persyaratan untuk memperoleh gelar Sarjana pada Program Studi Biologi, Fakultas Sains dan Teknologi, Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang

DEWAN PENGUJI

Pembimbing I : Dr. Kiptiyah, M.Si

(.....)

Pembimbing II : Dr. M. Mukhlis Fahrudin, M.S.I

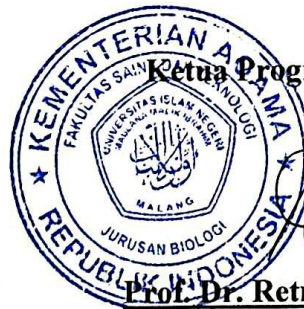
(.....)

Tim Penguji : Maharani Retna Duhita,
M.Sc.,PhD.Med.Sc.

(Ketua) (.....)

Azizatur Rahmah, M. Sc

(Anggota) (.....)



Ketua Program Studi Biologi

Prof. Dr. Retno Susilowati, M.Si
NIP. 196711131994022001

HALAMAN PERSEMBAHAN

Assalamu 'ailaikum Wr. Wb.

Alhamdulillah, Puji dan syukur dipanjatkan kepada Allah SWT atas kemurahan dan ridho-Nya, skripsi ini yang berjudul "Analisis Ekspresi Protein Rekombinan Chimera Multi-Epitope VP1me2-Fc sebagai Kandidat Antigen Vaksin HFMD pada Sistem *E.coli* dan HEK293A" dapat terselesaikan dengan baik dan tepat pada waktunya. Shalawat serta salam semoga senantiasa tercurah kepada Nabi Muhammad SAW yang telah menjadi teladan dalam menjalani kehidupan serta menjadi sumber inspirasi dalam menuntut ilmu. Dengan penuh rasa syukur dan kerendahan hati, skripsi ini penulis persembahkan kepada berbagai pihak yang telah memberikan doa, dukungan, semangat, serta bantuan selama perjalanan studi dan proses penyusunan skripsi ini.

1. Keluarga tercinta, yaitu Ayah Martono, Ibu Siti Romelah, dan Mas Anton yang selalu memberikan kasih sayang, doa, dukungan, serta pengorbanan yang tidak pernah terhenti. Terima kasih atas segala usaha, kesabaran, serta kepercayaan yang selalu diberikan kepada penulis. Setiap doa yang dipanjatkan, setiap nasihat yang diberikan, dan setiap bentuk dukungan yang diberikan menjadi kekuatan terbesar bagi penulis untuk terus melangkah dan bertahan hingga sampai pada titik ini. Semoga setiap langkah yang penulis capai menjadi bagian dari kebahagiaan dan kebanggaan bagi keluarga.
2. Ibu Dr. Kiptiyah, M.Si selaku dosen pembimbing skripsi yang telah meluangkan waktu, tenaga, dan pikiran untuk memberikan bimbingan, arahan, serta ilmu yang sangat berharga selama proses penyusunan skripsi ini.
3. Bapak Dr. M. Mukhlis Fahrudin, M.S.I selaku dosen pembimbing integrasi sains dan Islam yang telah memberikan wawasan mengenai keterkaitan antara ilmu pengetahuan dengan nilai-nilai keislaman.
4. Ibu Azizatur Rahmah, M.Sc selaku dosen wali yang telah memberikan arahan, dukungan, dan motivasi selama penulis menjalani masa studi.
5. Asst. Dr. Yaowaluck Maprang Roshorm dan Assoc. Prof. Dr. Kanokwan Poomputsa selaku kepala laboratorium Animal Cell Culture yang telah memberikan kesempatan, arahan, serta pengalaman berharga kepada penulis selama proses pembelajaran dan penelitian di laboratorium. Penulis juga mengucapkan terima kasih kepada Dr. Namphueng Butkhot, Dr. Kanokporn Polyiam, dan Virakorn Ploypanichcharoen selaku mentor di laboratorium Animal Cell Culture yang dengan penuh kesabaran memberikan bimbingan, pengetahuan, serta keterampilan selama proses penelitian berlangsung. Pengalaman tersebut

menjadi pembelajaran yang sangat berarti bagi penulis dalam memahami dunia penelitian secara lebih luas.

6. Rekan-rekan yang kebersamai proses penelitian ini, yaitu Azka, teman-teman PKL di KMUTT Thailand, serta teman-teman bimbingan Ibu Kiptiyah seperti Putri dan Izza yang selalu memberikan dukungan, bantuan, serta semangat selama proses penelitian hingga penyusunan skripsi.
7. Teman-teman Ma'had, khususnya keluarga kamar 29, yang telah memberikan banyak kebersamaan, dukungan, dan kehangatan selama proses perjalanan ini. Kebersamaan yang terjalin terasa begitu dekat hingga menghadirkan rasa seperti keluarga sendiri yang selalu ada dalam suka maupun duka.
8. Teman-teman Biologi C angkatan Ravalizim 2022 yang telah menjadi bagian dari perjalanan penulis selama masa perkuliahan serta memberikan banyak cerita, kebersamaan, dan dukungan.
9. Teman-teman Paguyuban Duta Kampus UIN Malang, khususnya Divisi People Development, yang telah banyak membantu penulis selama proses penyusunan skripsi, mulai dari persiapan berkas, berbagai kebutuhan administrasi dan tes, hingga memberikan dukungan dan kebersamaan, termasuk mengajak penulis beristirahat sejenak agar tetap semangat menjalani proses ini.
10. Ahmad Yudi Mubarroq yang selalu memberikan dukungan, perhatian, dan semangat kepada penulis selama proses penyusunan skripsi ini. Terima kasih atas kesabaran, motivasi, serta kehadiran yang menjadi penguat bagi penulis dalam melalui berbagai proses hingga akhirnya dapat menyelesaikan perjalanan ini.
11. Terakhir, untuk diri penulis sendiri, terima kasih karena telah bertahan, berjuang, dan tidak menyerah hingga sampai pada titik ini. Setiap proses yang dilalui menjadi pembelajaran berharga dalam perjalanan kehidupan.

Penulis juga menyampaikan terima kasih kepada berbagai pihak lain yang telah memberikan bantuan, dukungan, serta doa yang tidak dapat disebutkan satu per satu. Semoga segala kebaikan yang telah diberikan mendapatkan balasan yang berlipat dari Allah SWT. Semoga skripsi ini dapat memberikan manfaat serta menjadi langkah awal bagi penulis untuk terus belajar, berkembang, dan memberikan kontribusi yang lebih baik di masa yang akan datang.

Wassalamu'alaikum Wr. Wb.

MOTTO

“Apa yang melewatkanmu tidak akan pernah menjadi takdirku, dan apa yang ditakdirkan untukku tidak akan pernah melewatkanmu.”

- Umar bin Khattab

“Great things are not done by impulse, but by a series of small things brought together.”

- Vincent van Gogh

“Trust the process, Allah knows the best timing.”

- Fara

PERNYATAAN KEASLIAN TULISAN

Saya yang bertanda tangan dibawah ini:

Nama : Faradila Zahrotoul Nur Azizah
NIM : 2220602110090
Program Studi : Biologi
Fakultas : Sains dan Teknologi
Judul Penelitian : Analisis Ekspresi Protein Rekombinan Chimera Multi
Epitope VP1me2-Fc sebagai Kandidat Antigen Vaksin HFMD
pada Sistem *E.coli* dan HEK293A

Menyatakan dengan sebenarnya bahwa skripsi yang saya tulis ini benar-benar merupakan hasil karya saya sendiri, bukan merupakan pengambilalihan data, tulisan, atau pikiran orang lain yang saya akui sebagai hasil tulisan atau pikiran saya sendiri, kecuali dengan mencantumkan sumber cuplikan pada daftar pustaka. Apabila di kemudian hari terbukti atau dapat dibuktikan skripsi ini hasil jiplakan, maka saya bersedia menerima sanksi akademik maupun hukum atas perbuatan tersebut.

Malang, 30 April 2026
Yang membuat pernyataan,



Faradila Zahrotoul Nur Azizah
NIM. 220602110090

PEDOMAN PENGGUNAAN SKRIPSI

Skripsi ini tidak dipublikasikan namun terbuka untuk umum dengan ketentuan bahwa hak cipta ada pada penulis. Daftar Pustaka diperkenankan untuk dicatat, tetapi pengutipan hanya dapat dilakukan seizin penulis dan harus disertai kebiasaan ilmiah untuk menyebutkannya.

ANALISIS EKSPRESI PROTEIN REKOMBINAN CHIMERA MULTI-EPILOPE VP1Me2-Fc SEBAGAI KANDIDAT ANTIGEN VAKSIN HFMD PADA SISTEM *E.coli* DAN HEK293A

Faradila Zahrotul Nur Azizah, Kiptiyah, M. Mukhlis Fahrudin

Program Studi Biologi, Fakultas Sains dan Teknologi, Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang

ABSTRAK

Penyakit *Hand, Foot, and Mouth Disease* (HFMD) merupakan infeksi virus yang masih menjadi masalah kesehatan global, terutama pada anak usia dini. Kompleksitas serotipe dan tingginya mutasi virus menyebabkan vaksin monovalen belum mampu memberikan perlindungan silang yang optimal, sehingga diperlukan pendekatan vaksin multivalen. Penelitian ini bertujuan untuk mengkonstruksi dan mengevaluasi ekspresi protein rekombinan chimera multi-epitope VP1me2-Fc sebagai kandidat antigen vaksin HFMD pada sistem prokariotik dan eukariotik. Konstruksi gen VP1me2-Fc dilakukan menggunakan vektor pVAX1, kemudian diekspresikan pada *Escherichia coli* BL21 dan sel HEK293A. Analisis ekspresi dilakukan melalui Western blot, dan imunofluoresensi. Hasil menunjukkan bahwa protein VP1me2-Fc berhasil diekspresikan pada kedua sistem dengan berat molekul sekitar 107 kDa. Pada sistem prokariotik, protein terdeteksi namun menunjukkan indikasi degradasi. Sebaliknya, pada sistem eukariotik HEK293A, protein menunjukkan ekspresi yang lebih stabil, terlokalisasi di sitoplasma dan perinuklear, serta mengalami pemrosesan seluler yang baik. Klon 31 menunjukkan tingkat ekspresi dominan. Disimpulkan bahwa sistem HEK293A menunjukkan profil ekspresi yang lebih stabil dan spesifik dibanding sistem prokariotik. Penelitian ini memberikan dasar awal pengembangan kandidat vaksin multivalen HFMD, namun memerlukan uji lanjutan terkait imunogenisitas dan stabilitas protein.

Kata kunci: HFMD, VP1 multi-epitope, protein rekombinan, pVAX1, *Escherichia coli*, HEK293A.

**ANALYSIS OF THE EXPRESSION OF THE VP1Me2-Fc MULTI-EPITOPE
RECOMBINANT CHIMERA PROTEIN AS A CANDIDATE HFMD
VACCINE ANTIGEN IN *E.coli* AND HEK293A CELL SYSTEMS**

Faradila Zahrotul Nur Azizah, Kiptiyah, M. Mukhlis Fahrudin

Biology Study Program, Faculty of Science and Technology, Maulana Malik Ibrahim State
Islamic University, Malang

ABSTRACT

Hand, Foot, and Mouth Disease (HFMD) remains a global viral health problem, especially in young children. The diversity of serotypes and high mutation rate limit the effectiveness of monovalent vaccines, highlighting the need for a multivalent vaccine approach. This study aimed to construct and evaluate the expression of a multi-epitope chimeric recombinant protein, VP1me2-Fc, as a candidate antigen for HFMD vaccines in prokaryotic and eukaryotic systems. The VP1me2-Fc gene was constructed using the pVAX1 vector and expressed in *Escherichia coli* BL21 and HEK293A cells. Protein expression was analyzed using Western blot, and immunofluorescence. The results showed that VP1me2-Fc was successfully expressed in both systems with a molecular weight of approximately 107 kDa. In the prokaryotic system, the protein was detected but showed signs of degradation. In contrast, expression in HEK293A cells resulted in more stable protein, with cytoplasmic and perinuclear localization, indicating proper cellular processing. Clone 31 exhibited the dominant expression level. In conclusion, the HEK293A system is more optimal for producing VP1me2-Fc protein. This study provides a preliminary basis for the development of a multivalent HFMD vaccine candidate, although further studies on protein immunogenicity and stability are required.

Keywords: HFMD, VP1 multi-epitope, recombinant protein, pVAX1, *Escherichia coli*, HEK293A.

كمرشح لمستضد لقاح مرض اليد والقدم والفم في VP1me2-Fc تحليل تعبير البروتين المعاد تجميعه الكيميرا متعدد الببتيدات HEK293A و E. coli أنظمة

فاراديلة زهروتول نور عزيزة، كينيتيا، م. مخلص فخر الدين

برنامج دراسة علم الأحياء، كلية العلوم والتكنولوجيا، جامعة مولانا مالك إبراهيم الإسلامية الحكومية، مالانج

ملخص

عدوى فيروسية لا تزال تشكل مشكلة صحية عالمية، لا سيما بين الأطفال الصغار. ونظرًا لتعقيد الأنماط (HFMD) يُعد مرض اليد والقدم والفم الفيروسية وارتفاع معدل طفرات الفيروس، فإن اللقاحات أحادية التكافؤ لم تتمكن بعد من توفير الحماية المتبادلة المثلى، مما يستلزم اتباع نهج اللقاحات كمرشح لمستضد لقاح VP1me2-Fc يهدف هذا البحث إلى بناء وتقييم تعبير البروتين المعاد تجميعه الكيميري متعدد الببتيدات. متعددة التكافؤ، ثم تم التعبير عنه pVAX1 باستخدام ناقل VP1me2-Fc في الأنظمة البكتيرية والحيوانية. تم بناء جين (HFMD) مرض اليد والقدم والفم أظهرت النتائج .، والمناعة الفلورية Western blot تم تحليل التعبير باستخدام تقنية HEK293A وخلايا Escherichia coli BL21 في تم التعبير عنه بنجاح في كلا النظامين بوزن جزيئي يبلغ حوالي 107 كيلو دالتون. في النظام بدائي النواة، تم الكشف عن VP1me2-Fc أن بروتين ، أظهر البروتين تعبيرًا أكثر استقرارًا، حيث تركز في HEK293A البروتين لكنه أظهر علامات على التحلل. في المقابل، في النظام حقيقي النواة أظهر النسخة 31 مستوى تعبير مهمين. وخلصت الدراسة إلى أن نظام السيتوبلازم والمناطق المحيطة بالنواة، كما خضع لعملية معالجة خلوية جيدة توفر هذه الدراسة أساسًا أوليًا لتطوير لقاح متعدد التكافؤ مرشح لمرض اليد VP1me2-Fc هو الأكثر ملاءمة لإنتاج بروتين HEK293A والقدم والفم، لكنها تتطلب إجراء اختبارات إضافية تتعلق بالمناعة والاستقرار البروتيني.

الكلمات الرئيسية : HFMD، VP1 متعدد الببتيدات، بروتين مُعاد التركيب، pVAX1، Escherichia coli، HEK293A.

KATA PENGANTAR

Assalamualaiakum Warahmatullahi Wabarakatuh

Puji syukur kepada Allah SWT yang telah menganugrahkan rahmat dan hidayah-Nya, sehingga penulis dapat menyelesaikan proposal skripsi yang berjudul “Analisis Ekspresi Protein Rekombinan Chimera Multi-Epitope VP1me2-Fc sebagai Kandidat Antigen Vaksin HFMD pada Sistem *E.coli* dan HEK293A”. Tidak lupa shalawat dan salam disampaikan kepada junjungan Nabi besar Muhammad SAW. yang telah menegakkan agama Islam yang terpatri hingga akhir zaman. Ucapan terima kasih penulis sampaikan kepada seluruh pihak yang membantu menyelesaikan skripsi ini, terkhusus kepada:

1. Prof. Dr. Hj. Ilfi Nurdiana, M.Si., CHARM, CRMP selaku Rektor Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
2. Dr. Agus Mulyono, M.Kes selaku Dekan Fakultas Sains dan Teknologi, Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
3. Prof. Dr. Retno Susilowati, M.Si selaku Ketua Program Studi Biologi, Fakultas Sains dan Teknologi, Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
4. Asst. Dr. Yaowaluck Maprang Roshorm dan Dr. Namphueng Butkhot selaku dosen pembimbing lapangan *Animal Cell Culture Biotechnology*, yang telah banyak meluangkan waktu, tenaga, dan pikiran untuk memberikan bimbingan dengan penuh kesabaran.
5. Dr. Kiptiyah, M.Si selaku dosen pembimbing skripsi yang telah banyak meluangkan waktu, tenaga, dan pikiran untuk memberikan bimbingan dengan penuh kesabaran.
6. Dr. M. Mukhlis Fahrudin, M.S.I selaku dosen pembimbing agama yang telah banyak memberikan bimbingan terkait integrasi sains dan islam.
7. Azizatur Rahmah, M. Sc selaku dosen wali yang telah banyak meluangkan waktu, tenaga dan pikiran untuk memberikan bimbingan dengan penuh kesabaran.
8. Seluruh dosen dan laboran di *Animal Cell Culture Biotechnology*, School of Bioresource and Technology, King Mongkut’s University Thonburi Thailand yang setia menemani penulis dalam melakukan penelitian di laboratorium tersebut.

Semoga segala kebaikan yang diberikan oleh beberapa pihak tersebut kepada penulis mendapatkan balasan kebaikan dari Allah SWT. Semoga Allah Swt. senantiasa melimpahkan rahmat dan rida-Nya kepada kita semua. Aamiin.

Walaikumsallam Warahmatullahi Wabarakatuh

Malang, 03 September 2025

Penulis

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	ii
HALAMAN PERSETUJUAN	iii
HALAMAN PENGESAHAN	iv
HALAMAN PERSEMBAHAN	v
MOTTO	vii
PERNYATAAN KEASLIAN TULISAN	viii
PEDOMAN PENGGUNAAN SKRIPSI	ix
ABSTRAK	x
ABSTRACT	xi
ملخص	xii
KATA PENGANTAR	xiii
DAFTAR ISI	xiv
DAFTAR GAMBAR	xvi
DAFTAR LAMPIRAN	xvii
BAB I PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	6
1.3 Tujuan Penelitian.....	6
1.4 Manfaat Penelitian.....	6
1.5 Batasan Penelitian	6
BAB II KAJIAN PUSTAKA	8
2.1 <i>Hand, Foot, and Mouth Disease</i> (HFMD)	8
2.2 Vaksinasi HFMD	11
2.2.1 Vaksinisasi dalam Perspektif Islam	13
2.3 Multi-Epitope Chimeric Protein.....	16
2.3.1 VP1me	18
2.4 Metode Kloning dan Ekspresi	21
2.5 <i>E.coli</i>	23
2.6 HEK293A.....	26
2.7 Sistem Ekspresi Protein.....	27
2.8 Analisis Ekspresi Protein	29

BAB III METODE PENELITIAN	32
3.1 Rancangan Penelitian	32
3.2 Waktu dan Tempat Penelitian	32
3.3 Alat dan Bahan	33
3.3.1 Alat	33
3.3.2 Bahan	33
3.4 Prosedur Penelitian.....	34
3.4.1 Preparasi Sampel Ekspresi Protein.....	34
3.4.2 Transformasi dan Ekspresi Protein di Prokariotik (<i>E.coli</i> BL21).....	35
3.4.3 Transfeksi dan Ekspresi Protein di Eukariotik (Sel HEK293A)	35
3.4.4 Analisis Protein dengan Western Blot	36
3.4.5 Analisis Imunofluoresens	38
3.4.6 Analisis Data	39
 BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN.....	 41
4.1. Sistem Ekspresi Protein Rekombinan	41
4.1.1. Ekspresi Protein pada Sistem Prokariotik (<i>E.coli</i> BL21).....	41
4.1.2. Ekspresi Protein pada Sistem Eukariotik (HEK293A)	41
4.1.3. Perbandingan Sistem Ekspresi Prokariotik dan Eukariotik	48
4.2. Integrasi Sains dan Perspektif Islam terhadap Penelitian Pengembangan Vaksin Rekombinan VP1me2-Fc	50
 BAB V PENUTUP	 55
5.1 Kesimpulan.....	55
5.2 Saran.....	55
 DAFTAR PUSTAKA.....	 56
LAMPIRAN.....	65

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
Gambar 4.1 Hasil Western blot chemiluminescence protein chimeric VP1me2-Fc. ..	42
Gambar 4.2 Hasil pewarnaan TMB pada membran Western blot protein chimeric VP1me2-Fc.	43
Gambar 4.3 Hasil imunofluoresensi protein chimeric VP1me2-Fc di sel HEK293A.	44
Gambar 4.4 Hasil Western blot chemiluminescence protein rekombinan pVAX1.VP1me2-Fc.	46
Gambar 4.5 Hasil pewarnaan TMB pada membran Western blot protein chimeric VP1me2-Fc..	47

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
Lampiran 1 Dokumen Penelitian	65
Lampiran 2 Desain Konstruksi Genetik pVAX1.VP1me2-Fc	66
Lampiran 3 Proses Konstruksi Geenetik pVAX1.VP1me2-Fc	66
Lampiran 4 Proses Rapid Size Screening dan Konfirmasi	67
Lampiran 5 Hasil Transformasi Plasmid Rekombinan ke Sel E.coli BL21	68
Lampiran 6 Data Pengukuran Optical Density (OD) Kultur Bakteri Sebelum Induksi	69
Lampiran 7 Data Pengukuran Optical Density (OD) Setelah Penambahan IPTG.....	69
Lampiran 8 Protein Hasil Lisis Sel Menggunakan CelLytic™ B	69
Lampiran 9 Hasil SDS-PAGE pada E.coli BL21 dan HEK293a sistem	69

BAB I PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Upaya menjaga kesehatan dan mencegah penyakit merupakan bagian dari tanggung jawab manusia dalam mempertahankan keberlangsungan hidup. Dalam perspektif Islam, pencarian pengobatan atas suatu penyakit dipandang sebagai bentuk ikhtiar yang dianjurkan. Rasulullah SAW bersabda:

مَا أَنْزَلَ اللَّهُ دَاءً إِلَّا أَنْزَلَ لَهُ شِفَاءً (رواه البخاري رقم ٥٦٧٨)

Artinya: “*Tidaklah Allah menurunkan penyakit kecuali Dia juga menurunkan penawarnya.*” (HR Al-Bukhari No. 5678)

Hadits tersebut menegaskan bahwa setiap penyakit pada dasarnya memiliki potensi solusi yang dapat ditemukan melalui usaha dan penelitian manusia. Dengan demikian, pengembangan strategi preventif seperti vaksinasi bukanlah bentuk penolakan terhadap takdir, melainkan bagian dari tanggung jawab ilmiah dalam menjaga kualitas kehidupan, terutama bagi kelompok rentan seperti anak-anak (Zahid, 2024).

Secara global, penyakit infeksi akibat virus masih menjadi tantangan serius dalam kesehatan masyarakat. Analisis retrospektif kejadian darurat kesehatan dunia menunjukkan bahwa frekuensi wabah penyakit infeksi cenderung meningkat dalam beberapa dekade terakhir (Liu *et al.*, 2025). salah satu penyebabnya adalah karakteristik virus DNA memiliki tingkat mutasi tinggi sehingga memungkinkan terjadinya variasi genetik secara cepat dan meningkatkan kemampuan virus dalam menghindari respons imun inang (Adedokun *et al.*, 2025). sifat ini membuat penyakit berbasis virus sulit dikendalikan dan memerlukan pendekatan pencegahan yang adaptif

dan berkelanjutan.

Salah satu penyakit infeksi virus yang masih menjadi perhatian global adalah *Hand, Foot, and Mouth Disease* (HFMD). Penyakit ini umumnya menyerang anak-anak di bawah usia lima tahun dan memiliki tingkat penularan yang tinggi, terutama di kawasan Asia-Pasifik (Liang *et al.*, 2025). HFMD disebabkan oleh beberapa serotipe enterovirus, terutama *Enterovirus A71* (EV-A71), *Coxsackievirus A16* (CVA16), CVA6, dan CVA10 (Xie *et al.*, 2024). Meskipun sebagian besar kasus bersifat ringan dan sembuh sendiri, sebagian kecil dapat berkembang menjadi komplikasi serius seperti ensefalitis, meningitis, dan gangguan neurologis berat (Huang *et al.*, 2024).

Berdasarkan data epidemiologi, pada periode 2008-2012 terdapat sekitar 7,2 juta kasus HFMD dengan 2.457 kematian di Tiongkok (Xing *et al.*, 2014). Temuan ini menunjukkan bahwa meskipun HFMD umumnya bersifat ringan, penyakit ini tetap dapat menimbulkan komplikasi serius hingga kematian, terutama pada anak usia dini. Patogen utama yang berkontribusi terhadap virus HFMD meliputi EV-A71, CVA16, CVA10, dan CVA6 (Liu *et al.*, 2025). Di kawasan Asia-Pasifik, HFMD tergolong penyakit endemik dengan dua juta kasus setiap tahunnya selama 2009-2019, khususnya di Tiongkok dan negara Asia Tenggara (Liu *et al.*, 2025). EV-A71 diketahui menjadi penyebab utama kasus berat dan kematian pada anak usia dini, sementara CVA6 dan CVA10 semakin dominan dalam beberapa tahun terakhir (Liang *et al.*, 2025). Pergeseran dominasi serotipe ini menunjukkan dinamika epidemiologis yang kompleks dan menuntut pendekatan pencegahan yang lebih luas dibandingkan vaksin monovalen.

Data epidemiologis jangka panjang di Jianjing District menunjukkan bahwa selama periode 2009-2023 tercatat 50.645 kasus HFMD pada anak usia di bawah 10 tahun dengan insidens rata-rata 3.136,01 per 100.000 penduduk per tahun. Puncak kejadian terjadi pada tahun 2018 dengan insidens 6.260,63 per 100.000 penduduk, dan setelah periode pandemi COVID-19 terjadi peningkatan kembali sebesar 479,17% pada tahun 2023. Selain itu, sejak tahun 2018 serotipe CVA6 menjadi dominan, sementara EV-A71 dan CVA16 menunjukkan tren penurunan (Wu *et al.*, 2025). Temuan ini memperkuat bahwa dinamika serotipe HFMD bersifat fluktuatif dan memerlukan pendekatan vaksin dengan cakupan lebih luas.

Secara molekuler, *enterovirus* merupakan virus RNA beruntai tunggal berpolaritas positif dengan genom sekitar 7,4 kb yang mengkode protein struktural VP1, VP2, VP3, dan VP4 (Bello *et al.*, 2024). Di antara protein tersebut, VP1 dikenal sebagai protein kapsid utama yang bersifat imunodominan karena mengandung epitop netralisasi yang berperan penting dalam induksi antibodi protektif (Zhang *et al.*, 2023). Respon imun terhadap HFMD melibatkan mekanisme humoral melalui produksi antibodi IgM dan IgG serta respon seluler melalui aktivasi sel T CD4+ dan CD8+ (Jartti *et al.*, 2024). Oleh karena itu, VP1 menjadi target yang relevan dalam pengembangan vaksin berbasis antigen rekombinan.

Beberapa vaksin inaktivasi monovalen terhadap EV-A71 telah dikembangkan dan terbukti efektif dalam menurunkan kasus akibat serotipe tersebut. Namun, vaksin tersebut belum memberikan perlindungan silang yang optimal terhadap CVA16, CVA6, dan CVA10 (He *et al.*, 2021). Selain itu, variasi genetik dan mutasi pada protein kapsid, khususnya VP1, berpotensi mengurangi efektivitas netralisasi antibodi terhadap strain baru (Xie *et al.*, 2024). Kondisi ini menunjukkan bahwa pendekatan vaksin monovalen

belum cukup untuk mengatasi kompleksitas epidemiologi HFMD, sehingga perlu pendekatan vaksin berbasis multivalen.

Sebagai salah satu pendekatan, vaksin berbasis multi-epitope dan protein chimera telah banyak dikembangkan. Strategi ini menggabungkan beberapa epitope imunogenik dari berbagai serotipe dalam satu konstruksi rekombinan untuk meningkatkan cakupan imunogenitas (Huang *et al.*, 2024). Pendekatan ini memungkinkan induksi respons imun humoral dan seluler secara simultan serta berpotensi memberikan proteksi silang terhadap beberapa strain (Li *et al.*, 2025).

Penelitian oleh Bello *et al.*, (2024) berhasil merancang imunogen tetravalen berbasis protein chimera yang dinamakan VP1me. Konstruksi tersebut menggabungkan protein VP1 lengkap EV-A71 dengan enam epitop netralisasi dari CVA16, CVA6, dan CVA10 melalui pendekatan imunoinformatika. Konstruksi VP1me kemudian dikloning ke dalam plasmid pVAX1, yaitu vektor ekspresi mamalia yang umum digunakan dalam pengembangan DNA vaccine. Plasmid pVAX1 dirancang untuk sesuai standar keamanan regulatori dan mengandung promoter cytomegalovirus (CMV) yang kuat untuk mendorong ekspresi gen pada sel mamalia, serta elemen poliadenilasi untuk stabilitas transkrip (Niu *et al.*, 2026). Melalui sistem ini, antigen dapat diekspresikan setelah terinfeksi ke sel inang, sehingga pVAX1 menjadi platform penting dalam desain kandidat vaksin berbasis DNA.

Meskipun VP1me menunjukkan potensi imunogenik, studi sebelumnya belum mengevaluasi strategi modifikasi protein yang dapat meningkatkan stabilitas molekul dan mendukung ekspresi protein rekombinan secara lebih optimal. Salah satu pendekatan yang dapat dilakukan adalah penambahan domain Fc, yang diketahui mampu meningkatkan stabilitas protein, memperpanjang waktu paruh, serta

memfasilitasi interaksi dengan reseptor Fc pada sel imun (Deng *et al.*, 2020). Oleh karena itu, pengembangan konstruksi lanjutan berupa VP1me2-Fc menjadi langkah rasional untuk mengevaluasi potensi peningkatan performa molekuler dibandingkan desain sebelumnya. Selain perancangan konstruksi gen, keberhasilan produksi protein rekombinan juga bergantung pada pemilihan sistem ekspresi yang tepat.

Sistem ekspresi berperan penting dalam menentukan kuantitas dan kualitas protein yang dihasilkan pada produksi protein rekombinan. Sistem prokariotik seperti *Escherichia coli* BL21 menawarkan keunggulan berupa efisiensi biaya dan kecepatan produksi, meskipun tidak mendukung modifikasi pascatranslasi kompleks (Terol *et al.*, 2021). Sebaliknya, sistem eukariotik seperti HEK293A mampu menghasilkan protein dengan proses folding dan modifikasi yang lebih mendekati kondisi fisiologis mamalia (Sookhoo *et al.*, 2024). Oleh karena itu, perbandingan kedua sistem ini menjadi penting untuk menilai kelayakan produksi kandidat vaksin secara optimal.

Berdasarkan uraian tersebut, penelitian ini bertujuan untuk mengkonstruksi dan mengevaluasi ekspresi protein chimera multi-epitope VP1me2-Fc pada sistem prokariotik (*E.coli* BL21) dan eukariotik (HEK293A), serta menganalisis profil ekspresi dan karakteristik molekuler protein yang dihasilkan sebagai tahap awal dalam pengembangan kandidat vaksin multivalen terhadap HFMD. Dengan demikian, penelitian ini merupakan pengembangan lanjutan berbasis bioteknologi rekombinan yang mengintegrasikan desain *in silico* dengan validasi eksperimental melalui sistem prokariotik dan eukariotik. Pendekatan ini mengombinasikan efisiensi produksi prokariotik dan ketepatan modifikasi eukariotik untuk mendukung pengembangan kandidat vaksin tetravalen HFMD yang stabil dan imunogenik.

1.2 Rumusan Masalah

Rumusan masalah dalam penelitian adalah apakah konstruk pVAX1-VP1me2-Fc dapat diekspresikan secara optimal sebagai protein rekombinan pada sistem prokariotik (*E.coli* BL21) dan eukariotik (HEK293A)?

1.3 Tujuan Penelitian

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk menganalisis ekspresi protein rekombinan pVAX1-VP1me2-Fc pada sistem prokariotik (*E.coli* BL21) dan eukariotik (HEK293A).

1.4 Manfaat Penelitian

Manfaat dalam penelitian ini adalah sebagai berikut :

1. Berkontribusi ilmiah dalam bidang bioteknologi dan imunologi, khususnya dalam pengembangan vaksin DNA yang memanfaatkan protein chimera multi-epitope. Penelitian ini juga dapat memperkaya referensi ilmiah mengenai pemanfaatan vektor pAX1 pada sistem ekspresi prokariotik dan eukariotik untuk menghasilkan protein rekombinan.
2. Penelitian ini berpotensi menjadi landaasan awal dalam pengembangan vaksin multiserotipe terhadap penyakit HFMD melalui pendekatan ekspresi protein rekombinan pada sistem prokariotik dan eukariotik. Hasilnya juga dapat dimanfaatkan sebagai rujukan dalam optimalisasi teknik ekspresi protein rekombinan, baik untuk penelitian vaksin maupun aplikasi bioteknologi medis lainnya.

1.5 Batasan Penelitian

1. Penelitian ini dibatasi pada tahap kloning, dan ekspresi protein rekombinan VP1me2-Fc tanpa dilakukan uji imunogenitas, uji hewan, maupun uji klinis.

2. Sistem ekspresi yang digunakan terbatas pada *E.coli* DH5 α untuk kloning, *E.coli* BL21 untuk ekspresi prokariotik, dan HEK293A untuk ekspresi eukariotik.
3. Karakteristik protein dilakukan melalui analisis berat molekul dan deteksi ekspresi menggunakan SDS-PAGE, Western Blot, dan imunofluoresens.
4. Penelitian tidak melakukan pengukuran tingkat kemurnian protein secara detail, uji stabilitas protein, maupun formulasi vaksin.
5. Penelitian tidak membahas analisis struktur tiga dimensi atau konfirmasi lipatan protein secara biofisika.

BAB II KAJIAN PUSTAKA

2.1 *Hand, Foot, and Mouth Disease (HFMD)*

Hand, Foot, and Mouth Disease (HFMD) merupakan penyakit menular yang disebabkan oleh *enterovirus* dari genus *Enterovirus* dalam famili *Picornaviridae*. Penyakit ini terutama menyerang anak-anak di bawah usia lima tahun dan ditandai dengan gejala awal berupa demam ringan, rasa lelah, serta munculnya ruam vesikuler pada tangan, kaki, dan rongga mulut yang biasanya bertahan hingga satu minggu (Dai *et al.*, 2024; Koh *et al.*, 2016). HFMD pertama kali diidentifikasi pada tahun 1957 di Toronto sebagai sindrom vesikular dan kini telah menjadi penyakit endemik dengan pola wabah sporadis hingga epidemik, terutama di kawasan Asia, di mana *Enterovirus 71 (EV71)* dan *Coxsackievirus A16 (CVA16)* menjadi penyebab utama (Guo *et al.*, 2022; Koh *et al.*, 2016).

Penyebab utama HFMD adalah EV71 dan CVA16. EV71 bertanggung jawab atas sebagian besar kasus berat dan kematian (sekitar 70-90%), sedangkan CVA16 umumnya menyebabkan gejala ringan namun tetap memiliki tingkat penularan tinggi. Dalam beberapa tahun terakhir, strain seperti CVA6 dan CVA10 juga mulai muncul sebagai patogen baru yang penting, di mana CVA6 mendominasi wabah setelah 2014 di Tiongkok dengan proporsi hingga 57,68% dari total kasus (Dai *et al.*, 2024; Guo *et al.*, 2022). Secara klinis, HFMD ditandai dengan demam (38-39°C), sakit tenggorokan, dan penurunan nafsu makan pada 1-2 hari pertama, diikuti oleh ruam makulopapular atau vesikuler di tangan, kaki, dan mulut pada hari ke-3 hingga ke-5. Pada kasus berat terutama akibat EV71, komplikasi seperti ensefalitis, meningitis, atau paralisis dapat terjadi (Koh *et al.*, 2016; Mao *et al.*, 2016).

Penularan HFMD berlangsung melalui jalur *fecal-oral*, kontak langsung dengan sekresi tubuh (air liur, cairan vesikel, atau feses), serta droplet udara. Masa inkubasi virus berkisar 3-7 hari, dan penyebaran sering diperburuk oleh lingkungan padat seperti sekolah dan *daycare*, serta kondisi iklim tropis yang lembap. Di Asia, puncak kejadian HFMD umumnya terjadi pada musim panas antara Mei-Agustus dan gelombang sekunder pada Oktober-November (Chong *et al.*, 2012; Dai *et al.*, 2024). Secara epidemiologis, penyakit ini berdampak besar pada anak-anak dengan prevalensi hingga 84,42% pada usia 1-5 tahun, komplikasi neurologis pada 1-5% kasus, dan mortalitas mencapai 0,21‰ sebelum pandemi COVID-19 yang menurun menjadi 0,17‰ pascapandemi akibat penerapan intervensi non-farmasi (Dai *et al.*, 2024; J. Li *et al.*, 2015).

Secara global, HFMD telah berkembang menjadi ancaman kesehatan masyarakat serius. Di Zhengzhou, Tiongkok, tercatat lebih dari 200.000 kasus antara tahun 2009-2021, dengan EV71 mendominasi sebelum 2014 (48,56%) dan kemudian digantikan oleh strain lain (57,68%) setelah diperkenalkannya vaksin EV71 (Dai *et al.*, 2024). Pola serupa juga ditemukan di Taiyuan, di mana CVA16 beredar bersama EV71 sejak 2010 hingga 2021, dan munculnya subgenogroup B1a/B1b menunjukkan adanya evolusi genetik berkelanjutan (Guo *et al.*, 2022).

Epidemiologi HFMD menunjukkan prevalensi tertinggi di kawasan Asia-Pasifik seperti Tiongkok, Vietnam, dan negara-negara ASEAN dengan jutaan kasus tiap tahun. Faktor seperti kepadatan penduduk, sanitasi yang buruk, dan kondisi musim hujan mempercepat penyebarannya (Venkatachalam *et al.*, 2014; Li *et al.*, 2015). Etiologi HFMD melibatkan berbagai *enterovirus*, terutama EV71 dan CVA16 sebagai penyebab dominan, sementara CVA10 dan CVA6 muncul sebagai patogen baru dengan

manifestasi klinis atipikal seperti ruam yang lebih luas dan kasus ko-infeksi yang dapat memperburuk tingkat keparahan (Dong *et al.*, 2010; Meng *et al.*, 2012).

Manifestasi HFMD dapat berkisar dari gejala ringan seperti demam dan ruam hingga komplikasi berat seperti ensefalitis, paralisis flaksid akut, bahkan kematian. Secara sosial, penyakit ini menimbulkan dampak ekonomi dan pendidikan karena meningkatnya beban perawatan medis serta absensi sekolah anak (T. Yang *et al.*, 2020; Yee & Poh, 2018). Munculnya strain baru seperti CVA6 dan peningkatan kasus ko-infeksi menjadi tantangan besar dalam pengendalian HFMD. Selain itu, vaksin monovalen seperti *inactivated EV71* terbukti belum mampu memberikan perlindungan silang terhadap seluruh strain virus penyebab (Kuijpers *et al.*, 2025; D. Zhang *et al.*, 2025). Oleh karena itu, pengembangan vaksin multivalen yang dapat menargetkan berbagai jenis *enterovirus* menjadi prioritas untuk menekan beban global HFMD, terutama di wilayah endemik.

Langkah pencegahan melalui vaksinasi menjadi aspek krusial dalam pengendalian HFMD. Penelitian oleh Guo *et al.*, (2022) menunjukkan bahwa CVA16 dan EV71 terus beredar di Taiyuan dengan prevalensi tertinggi pada anak usia 1-5 tahun (84,42%), menegaskan pentingnya pemantauan genetik dalam pengembangan vaksin. Sementara itu, Dai *et al.*, (2024) mencatat penurunan tingkat keparahan penyakit setelah pandemi COVID-19, dari 13,46‰ menjadi 0,17‰, berkat penerapan intervensi non-farmasi. Namun, pola musiman penyakit ini tetap konsisten dengan puncak pada April-Juni dan Oktober-November. Oleh karena itu, pemahaman mendalam terhadap variasi genetik dan mekanisme imunogenisitas *enterovirus* menjadi landasan penting dalam pengembangan vaksin yang lebih efektif, termasuk pendekatan berbasis

rekombinan yang menggabungkan epitope dari berbagai strain patogen (Guo *et al.*, 2022; Koh *et al.*, 2016).

2.2 Vaksinasi HFMD

Vaksinasi Vaksinasi *Hand, Foot, and Mouth Disease* (HFMD) menjadi strategi utama dalam pencegahan penyakit ini, yang setiap tahunnya menyerang jutaan anak di kawasan Asia-Pasifik. Upaya vaksinasi berperan penting dalam menekan angka kasus berat dan kematian akibat komplikasi neurologis (He *et al.*, 2021; Hu *et al.*, 2024). Keberhasilan vaksin *inactivated EV-A71* yang dilisensikan di Tiongkok sejak tahun 2015 menjadi bukti nyata efektivitas vaksinasi, dengan efikasi lebih dari 90% terhadap kasus HFMD yang disebabkan oleh *EV-A71* dalam uji klinis fase III, sehingga membantu menurunkan beban penyakit di wilayah endemik (He *et al.*, 2021).

Berbagai jenis vaksin telah dikembangkan, salah satunya vaksin *whole-virus inactivated* yang menggunakan virus utuh yang dimatikan menggunakan formalin atau BEI. Pendekatan ini mempertahankan antigenisitas alami dan mampu memicu antibodi penetral yang kuat, terbukti mencegah 92,3-97,3% kasus berat HFMD (Hu *et al.*, 2024; Mao *et al.*, 2016). Selain itu, vaksin subunit berbasis protein rekombinan seperti VP1 dikembangkan untuk menargetkan epitope imunogenik spesifik tanpa risiko penggunaan virus hidup, meskipun respon imun yang dihasilkan cenderung lebih rendah dibandingkan vaksin *whole-virus* (Chong *et al.*, 2012; He *et al.*, 2021).

Pendekatan terbaru seperti vaksin *multi-epitope chimeric protein* menunjukkan prospek yang menjanjikan karena menggabungkan epitope konservatif dari VP1 *EV71* dan *CV16*, sehingga mampu menghasilkan respons imun silang dengan potensi efikasi di atas 85% terhadap berbagai varian strain (He *et al.*, 2021; Huo *et al.*, 2017). Meski demikian, vaksin konvensional seperti *whole-virus inactivated* memiliki sejumlah

keterbatasan, termasuk kebutuhan fasilitas biosafety tinggi, biaya produksi mahal, dan kurangnya proteksi silang terhadap *CVA16*, *CVA6*, maupun *CVA10*. Kondisi ini memicu munculnya wabah ko-infeksi dan menjadi alasan kuat untuk mengembangkan vaksin multivalen (Hu *et al.*, 2024; H. Y. Li *et al.*, 2013).

Keterbatasan lain dari vaksin *whole-virus inactivated* terletak pada risiko perubahan struktur epitope akibat proses inaktivasi, yang dapat menurunkan antigenisitas dan membuat efikasi hanya mencapai 80-90% terhadap *EV-A71* homotipe tanpa perlindungan berarti terhadap strain lain (Hu *et al.*, 2024; Mao *et al.*, 2016). Vaksin subunit rekombinan memang lebih aman dan mudah diproduksi, tetapi umumnya membutuhkan adjuvan tambahan untuk meningkatkan imunogenisitasnya. Efikasinya pun relatif lebih rendah, hanya sekitar 60-70% pada tahap pra-klinis, karena tidak mempertahankan struktur antigen alami (He *et al.*, 2021; Zhao *et al.*, 2013a).

Teknologi *multi-epitope chimeric protein* menawarkan solusi atas permasalahan tersebut. Dengan memanfaatkan desain *in silico* menggunakan basis data seperti IEDB, pendekatan ini memungkinkan perancangan vaksin tetravalen yang mampu memberikan proteksi silang lebih dari 80% terhadap *EV71*, *CVA16*, *CVA10*, dan *CVA6* pada model tikus (He *et al.*, 2021; Bello *et al.*, 2024). Meski begitu, masih terdapat kendala teknis seperti rendahnya hasil produksi (*yield*) pada vaksin berbasis *virus-like particle (VLP)*, yaitu hanya sekitar 10-50 mg/L, sehingga mendorong pengembangan protein chimeric yang lebih sederhana dan efisien untuk diproduksi (Hu *et al.*, 2024; C. Zhang *et al.*, 2015).

Vaksin *inactivated EV-A71* terbukti menurunkan insidensi HFMD akibat *EV71* hingga 70%, namun secara tidak langsung meningkatkan proporsi infeksi *CVA16* dan *CVA6* dari 30% menjadi 50% pasca-vaksinasi (Dai *et al.*, 2024; Hu *et al.*, 2024).

Fenomena ini memperkuat urgensi pengembangan vaksin multivalen untuk mencegah pergeseran etiologi penyakit. Oleh sebab itu, vaksin *multi-epitope chimeric* kini dianggap sebagai arah baru dalam pengembangan vaksin HFMD yang lebih komprehensif dan efektif.

Proses vaksinasi HFMD juga memerlukan perhatian serius pada sisi regulasi dan etika, terutama dalam memastikan keamanan dan efektivitas vaksin. Uji pra-klinis seperti pengujian toksisitas dan imunogenisitas menjadi langkah fundamental sebelum vaksin diuji secara klinis pada manusia. Pendekatan serupa telah sukses diterapkan dalam pengembangan vaksin penyakit infeksi lain seperti COVID-19 dan influenza, di mana stabilitas antigen dan imunogenisitas menjadi faktor penentu keberhasilan (He *et al.*, 2021; Hu *et al.*, 2024). Tantangan seperti efisiensi ekspresi dan kualitas protein juga menuntut pemilihan sistem ekspresi yang tepat, seperti *E.coli* yang menawarkan biaya produksi rendah, sementara sel *HEK293A* memberikan hasil dengan modifikasi pasca-translasi alami.

Dengan demikian, vaksinasi HFMD tidak hanya berfungsi sebagai bentuk perlindungan medis, tetapi juga menjadi fondasi penting dalam pengembangan vaksin multivalen yang lebih adaptif. Selain itu, dalam perspektif Islam, vaksin juga dipandang melalui kacamata etika penggunaan yang menekankan keamanan, kemaslahatan, dan tanggung jawab sosial dalam penerapannya.

2.2.1 Vaksinisasi dalam Perspektif Islam

Vaksinasi dalam pandangan Islam dipahami sebagai bentuk ikhtiar manusia dalam menjaga kesehatan serta mencegah penyakit, sejalan dengan prinsip *hifz an-nafs* (menjaga jiwa) yang termasuk dalam *maqashid syariah* atau tujuan utama syariat Islam. Prinsip ini menegaskan kewajiban umat Muslim untuk menghindari segala hal

yang dapat membahayakan diri sendiri maupun orang lain (Khoiri & Nasution, 2022; Nasution, 2020). Tubuh manusia dipandang sebagai amanah dari Allah SWT yang harus dijaga dengan baik, sehingga vaksinasi dianggap sebagai langkah preventif yang bernilai positif selama tidak bertentangan dengan ajaran agama. Islam memandang upaya menjaga kesehatan sebagai bagian dari ibadah, sebagaimana sabda Nabi Muhammad SAW bahwa “setiap penyakit ada obatnya kecuali kematian” (HR. Bukhari). Hadis ini mendorong umat untuk mencari solusi medis, termasuk vaksin, guna mencegah penyakit seperti HFMD yang rentan menyerang anak-anak (He *et al.*, 2021). Meski demikian, vaksinasi harus memenuhi aspek kehalalan, yakni tidak mengandung bahan haram seperti gelatin babi atau alkohol dalam kadar yang membahayakan. Dalam situasi darurat, penggunaan bahan *syubhat* (meragukan) dapat dibolehkan oleh lembaga seperti MUI, selama manfaatnya lebih besar dibandingkan mudharatnya (Itmam, 2022; Safrida *et al.*, 2022). Sebagai contoh, fatwa MUI terkait vaksin COVID-19 menegaskan bahwa vaksin dinilai halal apabila terbebas dari unsur haram, dan tetap diperbolehkan jika mengandung unsur *syubhat* dengan tujuan membawa *maslahat* bagi umat. Prinsip ini juga dapat diterapkan dalam pengembangan vaksin HFMD untuk melindungi anak-anak dari risiko komplikasi fatal (Huo *et al.*, 2017; Khoiri & Nasution, 2022).

Aspek halal-haram dalam bahan vaksin menjadi perhatian penting dalam hukum Islam. Vaksinasi diperbolehkan selama tidak mengandung unsur yang diharamkan atau membahayakan tubuh, sebagaimana ditegaskan dalam fatwa MUI yang mempertimbangkan prinsip *maslahah mursalah* (kebaikan umum) dan *darurah* (kondisi darurat) untuk vaksin yang mengandung bahan *syubhat* (Nasution, 2020;

Safrida *et al.*, 2022). Prinsip ini juga didukung oleh firman Allah dalam QS Al-Baqarah [2]: 195 :

وَأَنْفِقُوا فِي سَبِيلِ اللَّهِ وَلَا تُلْقُوا بِأَيْدِيكُمْ إِلَى التَّهْلُكَةِ وَأَحْسِنُوا إِنَّ اللَّهَ يُحِبُّ
الْمُحْسِنِينَ ﴿١٩٥﴾

Artinya : “Berinfaklah di jalan Allah, janganlah jerumuskan dirimu ke dalam kebinasaan, dan berbuatbaiklah. Sesungguhnya Allah menyukai orang-orang yang berbuat baik. (QS Al-Baqarah [2]: 195)

Ayat ini menegaskan bahwa manusia dilarang menjerumuskan diri ke dalam kebinasaan. Tafsir dari ayat tersebut, sebagaimana dijelaskan oleh Al-Qurthubi dan diperkuat oleh (Khoiri & Nasution, 2022), menekankan pentingnya mencegah penyakit sebagai bagian dari menjaga keselamatan jiwa. Vaksinasi, dengan demikian, merupakan bentuk nyata dari upaya pencegahan yang sejalan dengan sunnah Nabi (Itmam, 2022; Nasution, 2020). Demikian pula, QS At-Tin [95]: 4 yang berbunyi :

لَقَدْ خَلَقْنَا الْإِنْسَانَ فِي أَحْسَنِ تَقْوِيمٍ ﴿٤﴾

Artinya : “Sesungguhnya Kami telah menciptakan manusia dalam bentuk yang sebaik-baiknya” (QS At-Tin [95]: 4)

Ayat tersebut mengandung makna bahwa tubuh manusia harus dijaga sebagai amanah Allah, bukan diubah secara esensial (Khoiri & Nasution, 2022; Nasution, 2020). Oleh sebab itu, vaksinasi tidak hanya bernilai medis tetapi juga spiritual, selama dilakukan sesuai ketentuan syariah dan tidak menimbulkan bahaya yang lebih besar dibandingkan manfaatnya. Fatwa MUI mengenai vaksin COVID-19 juga menegaskan prinsip tersebut, yaitu kebolehan vaksin dalam kondisi darurat untuk kemaslahatan umat (Safrida *et al.*, 2022). Maka dari itu, pengembangan vaksin HFMD dapat dipandang sebagai bentuk penerapan nilai Islam yang berpadu dengan kemajuan sains, salah satunya melalui teknologi *multi-epitope chimeric protein*.

Selain itu, berbagai lembaga fatwa seperti MUI dan Dewan Fatwa Mesir menyatakan bahwa vaksin diperbolehkan apabila membawa manfaat besar bagi masyarakat dan tidak ada alternatif lain, meskipun mungkin mengandung unsur haram dalam jumlah kecil. Ketentuan ini didasarkan pada prinsip *maslahah* dan *darurah* dalam fikih Islam (Itmam, 2022; Nasution, 2020). Dalam konteks HFMD, pengembangan vaksin berbasis protein rekombinan seperti *multi-epitope chimeric protein* dapat menjadi solusi yang lebih etis dan halal karena tidak menggunakan bahan hewani atau virus hidup (Yee & Poh, 2018). Dengan demikian, vaksinasi dapat dimaknai sebagai bentuk rasa syukur atas nikmat kesehatan, di mana umat Muslim diajarkan untuk berikhtiar medis sambil tetap bertawakal kepada Allah SWT (Khoiri & Nasution, 2022). Oleh karena itu, perspektif Islam mendukung vaksinasi sebagai bagian dari ikhtiar untuk menjaga kehidupan dan menghindari kebinasaan, sejalan dengan prinsip keimanan dan kemajuan ilmu pengetahuan.

2.3 Multi-Epitope Chimeric Protein

Protein *multi-epitope chimeric* merupakan konstruksi protein rekombinan yang dirancang untuk menggabungkan beberapa epitope imunogenik berupa fragmen peptida pendek yang mampu memicu respons imun ke dalam satu molekul protein. Pendekatan ini berakar pada konsep *reverse vaccinology* dan *immunoinformatics*, yang memungkinkan pemilihan serta penggabungan epitope sel B, *cytotoxic T lymphocyte* (CTL), dan *helper T lymphocyte* (HTL) dari protein patogen guna menghasilkan vaksin yang mampu menstimulasi imunitas humoral dan seluler secara bersamaan (Andongma *et al.*, 2023; Mortazavi *et al.*, 2024). Tahap awalnya melibatkan identifikasi protein antigenik dari patogen target, diikuti dengan prediksi *in silico* berdasarkan parameter seperti antigenisitas, konservasi, non-alergenitas, dan afinitas pengikatan terhadap

MHC. Epitope yang terpilih kemudian disatukan menggunakan *linker* tertentu, seperti GPVPG untuk HTL dan AAY untuk CTL, serta sering ditambahkan adjuvan seperti β -defensin atau PADRE untuk meningkatkan imunogenisitas (Al-Madhagi *et al.*, 2024; Sharma *et al.*, 2024). Protein hasil rekombinasi ini umumnya stabil, larut, dan mampu berinteraksi dengan reseptor imun seperti TLR2 atau TLR4, sebagaimana dibuktikan pada penelitian terhadap *Mycobacterium tuberculosis* dan *Taenia spp.* (Andongma *et al.*, 2023; Sharma *et al.*, 2024). Dalam konteks HFMD yang disebabkan oleh *enterovirus* seperti coxsackievirus A16 dan enterovirus 71, pendekatan multi-epitope berfokus pada epitope konservatif dari protein virus VP1 untuk memberikan perlindungan lintas serotipe (Bello *et al.*, 2024; Siddiki *et al.*, 2025).

Keunggulan utama vaksin berbasis *multi-epitope chimeric* adalah kemampuannya mengaktifasi berbagai jalur sistem imun secara bersamaan. Epitope sel B berperan dalam produksi antibodi sebagai respons humoral, sementara CTL dan HTL berfungsi mengaktifkan sel T sitotoksik dan sel T penolong guna memperkuat imunitas seluler (Mortazavi *et al.*, 2024). Aktivasi ganda ini sangat penting dalam infeksi HFMD, di mana antibodi berperan menetralkan virus dan sel T membantu membersihkan sel yang terinfeksi (Luo *et al.*, 2021; Yee & Poh, 2018). Selain itu, vaksin jenis ini lebih aman dibandingkan vaksin berbasis virus utuh karena tidak mengandung komponen patogen yang berpotensi toksik atau menimbulkan reaksi balik terhadap virulensi (Al-Madhagi *et al.*, 2024; Andongma *et al.*, 2023). Penggunaan epitope terpilih juga meminimalkan risiko reaksi alergi atau autoimunitas, sebagaimana dibuktikan melalui uji *in silico* terkait alergenitas dan toksisitas (Siddiki *et al.*, 2025). Studi mengenai vaksin HFMD menunjukkan bahwa konstruksi berbasis epitope VP1

memiliki stabilitas tinggi serta bersifat non-alergenik, menjadikannya kandidat potensial untuk pengembangan klinis (Chen *et al.*, 2024; Siddiki *et al.*, 2025).

Keunggulan lain dari vaksin *multi-epitope chimeric* terletak pada fleksibilitasnya dalam proses pengembangan dan adaptasi. Melalui bantuan perangkat *immunoinformatics*, peneliti dapat memilih epitope konservatif lintas strain atau spesies untuk merancang vaksin berspektrum luas yang efektif terhadap berbagai serotipe penyebab HFMD, seperti coxsackievirus A16 dan enterovirus 71 (Bello *et al.*, 2024; Mortazavi *et al.*, 2024). Pemilihan *linker* dan adjuvan juga dapat disesuaikan guna mengoptimalkan presentasi epitope dan stimulasi imun. Proses *in silico cloning* ke dalam vektor seperti pET28a (+) memastikan kompatibilitas dengan sistem ekspresi prokariotik maupun eukariotik (Al-Madhagi *et al.*, 2024; Siddiki *et al.*, 2025). Pendekatan berbasis komputasi ini tidak hanya menghemat biaya dan waktu eksperimen, tetapi juga meningkatkan efisiensi prediksi efektivitas vaksin sebelum tahap uji laboratorium (Mortazavi *et al.*, 2024). Dalam pengembangan vaksin HFMD, epitope VP1 menjadi komponen penting karena sifat imunogeniknya yang tinggi dan tingkat konservasi yang luas antar serotipe *enterovirus*, menjadikannya target utama dalam desain vaksin modern berbasis *multi-epitope chimeric protein* (Luo *et al.*, 2021; Mao *et al.*, 2016).

2.3.1 VP1me

VP1 merupakan salah satu protein struktural utama pada kapsid *enterovirus* yang berperan penting dalam pengikatan virus dengan reseptor sel inang serta memicu respons imun protektif. Protein ini termasuk dalam poliprotein P1 yang kemudian diproses menjadi empat subunit, yaitu VP1, VP2, VP3, dan VP4. Di antara keempatnya, VP1 terletak pada permukaan virion dan mengandung epitope netralisasi

utama seperti SP70 (aa208-222) dan PEP71 (aa211-225) yang berfungsi menstimulasi pembentukan antibodi netralisasi untuk mencegah infeksi (Chen *et al.*, 2019; Chi *et al.*, 2025). Dengan panjang sekitar 297 asam amino, VP1 memainkan peran penting dalam tahapan adsorpsi dan *uncoating*, di mana protein ini berinteraksi dengan reseptor seperti SCARB2 guna memfasilitasi masuknya virus ke dalam sel (Chi *et al.*, 2025). Dalam penyakit HFMD, VP1 dari EV71 dan CVA16 menjadi target utama karena mampu memicu respons imun humoral dan seluler yang kuat. Studi menunjukkan bahwa VP1 dapat menstimulasi produksi IFN- γ dan IL-2 dari sel T CD4⁺ maupun CD8⁺, yang berperan penting dalam eliminasi sel terinfeksi (Chen *et al.*, 2019; Yee & Poh, 2018). Struktur VP1 yang kaya *surface loop* menjadikannya sangat imunogenik, karena mampu mempertahankan konformasi epitopenya selama infeksi. Hal ini membuat VP1 tidak hanya efektif menimbulkan respons protektif, tetapi juga relevan untuk pengembangan vaksin yang dapat mengenali berbagai varian virus (Wu *et al.*, 2017).

VP1 dipilih sebagai target utama dalam desain vaksin *multi-epitope* karena memiliki tingkat konservasi tinggi (80-90% homologi antar-strain) serta berfungsi sebagai antigen imunodominan yang mampu memberikan perlindungan silang terhadap berbagai serotipe penyebab HFMD, termasuk EV71, CVA16, CVA10, dan CVA6 (Kanse *et al.*, 2023). Analisis *immunoinformatics* mengungkap bahwa VP1 mengandung epitope linear dan konformasional yang stabil, sehingga mendukung perancangan vaksin tetravalen dengan efektivitas mencapai lebih dari 80% pada model hewan (Kanse *et al.*, 2023; Luo *et al.*, 2021). Selain itu, VP1 terbukti menginduksi respons T-sel yang lebih kuat dibandingkan antigen lain, di mana sel CD8⁺ menghasilkan IFN- γ hingga 1,5 kali lebih tinggi, meningkatkan eliminasi sel terinfeksi

dan mencegah komplikasi neurologis (Chen *et al.*, 2019; Yee & Poh, 2018). Dalam vaksin *chimeric*, VP1 sering dijadikan kerangka utama karena epitopenya, seperti PEP71, dapat digabungkan dengan epitope dari virus lain seperti VZV untuk menghasilkan vaksin kombinasi yang memberikan proteksi ganda terhadap HFMD dan varisela (Huo *et al.*, 2017; Wu *et al.*, 2017). Keunggulan ini menjadikan VP1 kandidat ideal untuk vaksin *multi-epitope*, dengan hasil prediksi *in silico* menunjukkan nilai antigenisitas >0,9 dan toksisitas negatif, yang memastikan tingkat keamanan dan efektivitas tinggi (Bello *et al.*, 2024). Analisis struktur 3D juga menunjukkan bahwa *loop* permukaan VP1 mampu mempertahankan bentuk konformasinya selama proses ekspresi rekombinan, sehingga menjadikannya target yang optimal untuk vaksin subunit maupun *chimeric* (Mao *et al.*, 2016; Ren *et al.*, 2015).

Modifikasi epitope pada VP1 terbukti dapat meningkatkan efektivitas vaksin secara signifikan dengan memperkuat respons imun serta memperluas perlindungan silang terhadap berbagai serotipe *enterovirus*. Studi terbaru melaporkan bahwa vaksin mRNA berbasis VP1 yang dimodifikasi dengan nukleosida mampu menstimulasi respons sel T CD4⁺ dan CD8⁺ lebih kuat, dengan peningkatan kadar IFN- γ dan IL-2 hingga 2-3 kali lipat dibandingkan vaksin inaktivasi tradisional, menghasilkan perlindungan penuh (100%) terhadap infeksi EV71 pada model tikus (Chen *et al.*, 2019; Chi *et al.*, 2025). Selain itu, penggabungan epitope PEP71 ke dalam *virus-like particle (VLP) chimeric* meningkatkan afinitas antigen-antibodi hingga dua kali lipat, memungkinkan netralisasi silang terhadap EV71 dan CVA16 dengan efektivitas di atas 85% (Luo *et al.*, 2021; Wu *et al.*, 2017). Desain vaksin berbasis *multi-epitope* dengan modifikasi VP1 melalui *immunoinformatics* juga menghasilkan skor antigenisitas 0,9-1,0 dan toksisitas negatif, menunjukkan peningkatan imunogenisitas dengan

keseimbangan respons sel Th1/Th2 yang baik (Kanase *et al.*, 2023). Selain meningkatkan efektivitas, modifikasi ini juga menurunkan potensi autoimunitas dengan mengeliminasi epitope toksik, menjadikan vaksin *chimeric VP1me* lebih aman dan fleksibel untuk pengembangan vaksin tetravalen (Bello *et al.*, 2024; Huo *et al.*, 2017). Oleh karena itu, produksi protein rekombinan berbasis VP1 membutuhkan penerapan teknologi bioteknologi rekombinan yang presisi dan efisien.

2.4 Metode Kloning dan Ekspresi

Metode kloning dan ekspresi protein merupakan tahapan sentral dalam bioteknologi rekombinan yang digunakan untuk menghasilkan protein spesifik dari gen target. Proses ini diawali dengan isolasi gen target, di mana sekuens DNA yang mengkode protein tertentu, seperti *receptor binding domain* (RBD) SARS-CoV-2 atau VP1 dari enterovirus, diperoleh dari DNA genomik atau cDNA menggunakan teknik PCR dengan primer spesifik (Ghaderi *et al.*, 2024; Gholami *et al.*, 2018). Gen tersebut kemudian disisipkan ke dalam plasmid rekombinan, umumnya menggunakan vektor seperti pET-21b atau pET-28a yang dilengkapi *multiple cloning sites* (MCS), promoter kuat T7, serta tag afinitas seperti His-tag untuk mempermudah proses pemurnian. Teknik kloning dapat dilakukan melalui metode klasik berbasis enzim restriksi dan ligase, maupun dengan pendekatan modern seperti *ligation-independent cloning* (LIC) dan *Golden Gate cloning* yang lebih efisien dan bebas *scar* pada sekuens (Celie *et al.*, 2016; P. Wu *et al.*, 2018). Setelah konstruksi plasmid selesai, vektor rekombinan ditransformasikan ke dalam sel inang, *Escherichia coli* BL21 (DE3) untuk sistem prokariotik atau sel HEK293A untuk sistem eukariotik, menggunakan metode seperti elektroporasi atau transformasi kimiawi. Selanjutnya, ekspresi protein diinduksi, dengan IPTG pada *E. coli* untuk mengaktifkan promoter T7, atau melalui sinyal transien

pada HEK293A. Protein yang dihasilkan kemudian dimurnikan menggunakan teknik kromatografi afinitas atau *ion-exchange* hingga mencapai tingkat kemurnian tinggi, seperti yang terlihat pada protein RBD SARS-CoV-2 dengan berat molekul sekitar 27 kDa (Ghaderi *et al.*, 2024).

Metode ini memiliki sejumlah keunggulan, antara lain efisiensi tinggi dalam produksi protein, fleksibilitas sistem ekspresi, serta kemampuan menghasilkan protein dengan modifikasi tertentu. Sistem *E.coli* banyak digunakan karena pertumbuhannya cepat, biayanya rendah, dan mampu menghasilkan protein dalam jumlah besar; penggunaan IPTG sebesar 0,7 mM, terbukti menghasilkan pita protein yang jelas pada SDS-PAGE (Ghaderi *et al.*, 2024; Gholami *et al.*, 2018). Di sisi lain, sel HEK293A menjadi pilihan utama untuk ekspresi protein dengan modifikasi pasca-translasi (PTM) seperti glikosilasi, yang esensial bagi antigenisitas protein RBD SARS-CoV-2 dalam interaksinya dengan reseptor ACE2 (Chen *et al.*, 2024; Tan *et al.*, 2021). Teknik modern seperti LIC dan *recombination-based cloning* juga terbukti meningkatkan efisiensi kloning hingga lebih dari 90% dibandingkan metode konvensional (Celie *et al.*, 2016; Wu *et al.*, 2018). Desain vektor dengan tag afinitas serta optimasi kodon berperan penting dalam menjaga stabilitas dan fungsionalitas protein, sebagaimana ditunjukkan oleh ekspresi protein betatrophin yang mempertahankan struktur α -helix berdasarkan analisis *circular dichroism* (Gholami *et al.*, 2018). Fleksibilitas ini memungkinkan produksi protein multi-epitope untuk vaksin, seperti VP1me pada HFMD, yang terbukti memiliki imunogenisitas tinggi (Luo *et al.*, 2021).

Metode ini juga memiliki sejumlah tantangan teknis. Salah satunya adalah pembentukan *inclusion bodies* pada ekspresi protein di *E.coli*, yang membutuhkan langkah refolding agar protein kembali aktif secara biologis, sebagaimana terjadi pada

ekspresi RBD SARS-CoV-2 (Ghaderi *et al.*, 2024). Sistem prokariotik juga tidak mampu melakukan PTM kompleks seperti glikosilasi, yang dapat mengurangi fungsi biologis protein dibandingkan dengan sistem eukariotik seperti HEK293A (Tan *et al.*, 2021). Selain itu, perbedaan penggunaan kodon antar spesies dapat menurunkan efisiensi translasi, sehingga perlu dilakukan optimasi kodon (Celie *et al.*, 2016). Meskipun HEK293A menawarkan ekspresi protein yang lebih mirip dengan kondisi alami, sistem ini memiliki kelemahan berupa waktu kultur lebih lama dan biaya produksi yang lebih tinggi dibandingkan *E.coli* (Tan *et al.*, 2021). Tantangan lain termasuk potensi kontaminasi endotoksin pada sistem prokariotik dan kesulitan mencapai ekspresi homogen untuk protein berukuran besar atau kompleks (Gholami *et al.*, 2018). Untuk mengatasi kendala tersebut, digunakan strategi seperti penambahan tag solubilitas (MBP, GST) dan penggunaan media serum-free pada HEK293A guna meningkatkan hasil serta aktivitas biologis protein (Chen *et al.*, 2024; Wu *et al.*, 2018). Dalam konteks penelitian ini, sistem ekspresi yang diterapkan mencakup dua pendekatan, yaitu *E.coli* sebagai model prokariotik dan HEK293A sebagai model eukariotik.

2.5 *E.coli*

Escherichia coli (*E.coli*) merupakan sistem ekspresi protein rekombinan yang paling banyak digunakan karena karakteristiknya yang efisien dan ekonomis. Bakteri ini mampu tumbuh sangat cepat, dengan waktu penggandaan sekitar 20-30 menit pada kondisi optimal, sehingga ideal untuk produksi protein skala besar dengan biaya kultur rendah (Rosano & Ceccarelli, 2014). Selain itu, manipulasi genetiknya relatif mudah dilakukan, terutama pada strain seperti BL21(DE3) yang mengandalkan promotor T7 terinduksi IPTG untuk menghasilkan ekspresi protein tinggi, termasuk protein chimeric

multi-epitope untuk pengembangan vaksin dalam waktu 12-24 jam (Lozano Terol *et al.*, 2021a; Ojima *et al.*, 2025). Keunggulan ini menjadikan *E.coli* sangat fleksibel untuk keperluan penelitian maupun industri, serta dalam produksi insulin manusia dan enzim terapeutik. Sistem ini juga mudah diskalakan dari kultur laboratorium ke bioreaktor, memungkinkan produksi hingga level gram per liter tanpa memerlukan fasilitas kultur sel mamalia yang mahal (Lozano Terol *et al.*, 2021a). Lebih lanjut, *E.coli* mendukung penggunaan vektor seperti pET-28a yang memungkinkan penambahan tag afinitas yakni His-tag untuk proses pemurnian yang cepat, menjadikannya efisien dalam produksi protein vaksin seperti RBD SARS-CoV-2 atau VP1 enterovirus penyebab HFMD (Ghaderi *et al.*, 2024; Huo *et al.*, 2017). Dalam konteks penelitian vaksin HFMD, sistem ini kerap dimanfaatkan untuk ekspresi awal protein multi-epitope dengan biaya minimal, sehingga mempermudah proses screening kandidat vaksin sebelum tahap uji klinis (Bello *et al.*, 2024; Luo *et al.*, 2021).

Walaupun unggul dalam efisiensi dan biaya, *E.coli* memiliki keterbatasan penting, terutama karena tidak mampu melakukan modifikasi pasca-translasi (PTM) kompleks seperti glikosilasi, fosforilasi, dan sulfatasi yang berperan penting dalam menjaga stabilitas serta antigenisitas protein vaksin seperti VP1 pada HFMD (Ducker *et al.*, 2023). Keterbatasan ini sering mengakibatkan pembentukan inclusion bodies, yakni agregat protein tidak larut yang dapat mencapai lebih dari 50% dari total protein yang diekspresikan. Kondisi tersebut menurunkan kelarutan protein dan memerlukan langkah refolding menggunakan bahan kimia seperti urea atau guanidin hidroklorida, yang dapat mengurangi aktivitas biologis hingga 30-50% (Lozano Terol *et al.*, 2021a). Selain itu, adanya kontaminasi endotoksin dari dinding sel *E.coli* (lipopolisakarida) dapat mencapai 1-10 EU/ μ g protein dan berpotensi menimbulkan respon inflamasi,

sehingga diperlukan tahap pemurnian tambahan dengan kolom endotoksin removal (Ducker *et al.*, 2023). Dalam pengembangan vaksin HFMD, absennya PTM kompleks di *E.coli* terbukti dapat menurunkan afinitas antigen-antibodi hingga 50% dibandingkan protein yang diproduksi oleh sistem eukariotik yang memiliki PTM alami (Chen *et al.*, 2019; Luo *et al.*, 2021). Oleh karena itu, meskipun *E.coli* tetap efisien untuk produksi massal, keterbatasannya dalam menghasilkan protein dengan struktur kompleks menjadikannya kurang ideal untuk vaksin yang membutuhkan konformasi protein menyerupai bentuk aslinya (Ducker *et al.*, 2023; Tan *et al.*, 2021).

Selain keterbatasan pada PTM, *E.coli* juga menghadapi masalah bias kodon. Gen yang berasal dari organisme eukariotik sering mengandung kodon langka yang jarang digunakan oleh *E.coli*, sehingga dapat menurunkan efisiensi translasi hingga 50% tanpa optimasi kodon (Ducker *et al.*, 2023; Lozano Terol *et al.*, 2021a). Protein yang dihasilkan pun cenderung kurang stabil di lingkungan fisiologis manusia karena tidak memiliki modifikasi pasca-translasi yang mendukung kestabilan struktur, sehingga masa hidupnya bisa 2-3 kali lebih pendek dibandingkan protein yang diekspresikan dalam sistem mamalia (Rosano & Ceccarelli, 2014). Contohnya, ekspresi protein VP1 dari virus penyebab HFMD di *E.coli* menghasilkan antigen dengan daya imunogenik yang lebih rendah dibandingkan ekspresi di HEK293A, di mana PTM seperti glikosilasi mampu meningkatkan interaksi dengan reseptor imun (Ghaderi *et al.*, 2024; Tan *et al.*, 2021). Untuk mengatasi keterbatasan ini, beberapa strategi dapat diterapkan, seperti penambahan tag solubilitas HIS-Tag atau ko-ekspresi chaperon untuk meningkatkan kelarutan hingga 70-80% (Ducker *et al.*, 2023; Lozano Terol *et al.*, 2021b). Meski demikian, sistem eukariot seperti HEK293A tetap menjadi

alternatif yang lebih unggul dalam menghasilkan protein dengan struktur dan fungsi mendekati aslinya.

2.6 HEK293A

HEK293A merupakan lini sel eukariotik mamalia yang berasal dari embrio ginjal manusia dan banyak dimanfaatkan dalam produksi protein rekombinan karena kemampuannya melakukan modifikasi pasca-translasi (PTM), seperti glikosilasi N-linked, pembentukan ikatan disulfida, dan pelipatan kompleks (Chen *et al.*, 2024; Durocher & Butler, 2009). Adanya PTM ini memungkinkan protein rekombinan, termasuk protein VP1 chimeric untuk vaksin *Hand, Foot, and Mouth Disease* (HFMD), membentuk struktur tiga dimensi menyerupai protein native sehingga meningkatkan afinitas antigen-antibodi hingga 2-3 kali lipat. Mekanisme ini penting untuk memastikan pengenalan optimal oleh limfosit B dan menghasilkan antibodi netralisasi terhadap epitope SP70 dan PEP71 dari strain EV71, CVA16, CVA6, dan CVA10 (Bello *et al.*, 2024).

Keunggulan lain dari HEK293A adalah kemudahan kultur dalam media bebas serum seperti FreeStyle 293, waktu penggandaan sel yang relatif singkat (24-36 jam), serta stabilitas genetik yang mendukung ekspresi jangka panjang menggunakan vektor seperti pcDNA.1 melalui transfeksi polietilenimin (Chen *et al.*, 2024; Durocher & Butler, 2009). Walaupun yield proteinnya lebih rendah, yaitu sekitar 10-50 mg/L dibandingkan *E.coli* yang mampu mencapai 50-100 mg/L, HEK293A menghasilkan protein dengan antigenisitas lebih baik. Peningkatan ini tercermin pada respons imun seluler CD8+ hingga 1,5 kali lipat serta efikasi vaksin tetravalen HFMD yang lebih tinggi dibandingkan protein prokariotik atau virus-like particles (VLP) (Pereira & Khan, 2017). Oleh karena itu, HEK293A dipandang sebagai solusi atas keterbatasan

E.coli yang tidak mampu melakukan PTM, sehingga menjadi sistem ekspresi yang ideal, baik untuk produksi protein antigenik di laboratorium maupun pengembangan industri biomedis. Untuk memahami lebih jauh pemilihan kedua sistem ini, penting dibahas terlebih dahulu mengenai sistem ekspresi protein secara umum.

2.7 Sistem Ekspresi Protein

Sistem ekspresi protein prokariotik seperti *Escherichia coli* dan sistem eukariotik seperti HEK293A memiliki karakteristik yang berbeda, sehingga pemilihannya sangat bergantung pada kebutuhan dan kompleksitas protein yang akan diproduksi. *E.coli* menjadi pilihan paling populer karena efisiensi dan biayanya yang rendah, waktu penggandaan cepat (20-30 menit), serta kemampuan menghasilkan protein dalam jumlah besar hingga 50-100 mg/L kultur (Zhang *et al.*, 2021). Sistem ini ideal untuk produksi protein sederhana, termasuk enzim dan subunit vaksin seperti receptor binding domain (RBD) SARS-CoV-2 atau VP1 untuk vaksin HFMD, dengan memanfaatkan vektor pET-28a yang diinduksi IPTG (Ghaderi *et al.*, 2024; Huo *et al.*, 2017). Keunggulan lain *E.coli* terletak pada kemudahan rekayasa genetik, seperti melalui optimasi kodon yang dapat meningkatkan efisiensi translasi hingga 80%, serta kemampuannya untuk diskalakan dari kultur laboratorium ke bioreaktor industri (Ducker *et al.*, 2023; L. Zhang *et al.*, 2021). Namun demikian, sistem ini memiliki keterbatasan besar, yaitu ketidakmampuannya melakukan modifikasi pasca-translasi (PTM) kompleks seperti glikosilasi, fosforilasi, dan asetilasi yang penting bagi stabilitas dan fungsi biologis protein, khususnya antigen vaksin (Jäger *et al.*, 2013; Ooi *et al.*, 2016). Selain itu, terbentuknya inclusion bodies pada lebih dari 50% protein hasil ekspresi sering menurunkan aktivitas biologis hingga 30-50% setelah proses refolding,

sementara risiko kontaminasi endotoksin sebesar 1-10 EU/ μ g protein menambah tahapan pemurnian yang diperlukan (Ducker *et al.*, 2023).

Sebaliknya, sistem eukariotik seperti HEK293A menawarkan keunggulan dalam menghasilkan protein dengan karakteristik yang lebih menyerupai protein manusia. Sistem ini mampu melakukan berbagai jenis PTM seperti glikosilasi N- dan O-linked, fosforilasi, serta asetilasi yang penting untuk menjaga struktur dan fungsi protein kompleks seperti antibodi, vektor virus, dan protein vaksin dengan antigenisitas tinggi (Jäger *et al.*, 2013; Ooi *et al.*, 2016). Dalam pengembangan vaksin HFMD, HEK293A mampu mengekspresikan protein VP1 atau chimeric multi-epitope dengan tingkat glikosilasi yang meningkatkan respons imun hingga 1,5-2 kali lipat dibandingkan *E.coli*, dengan efikasi proteksi mencapai lebih dari 85% terhadap EV71 dan CVA16 pada model hewan (Chen *et al.*, 2024; Luo *et al.*, 2021). Sistem ini juga mendukung efisiensi transfeksi tinggi hingga 90% menggunakan PEI, dapat dikultur secara suspensi tanpa serum, dan terbukti menghasilkan hingga 696 mg/L protein dalam bioreaktor 2 L, seperti pada produksi erythropoietin (EPO) tanpa epitop imunogenik non-manusia (Chin *et al.*, 2019; Jalsić *et al.*, 2023). Namun, keunggulan ini diimbangi oleh biaya produksi yang tinggi, waktu pertumbuhan yang lebih lama (24-36 jam), serta variasi glikosilasi antar batch yang membutuhkan kontrol proses yang ketat (Ducker *et al.*, 2023; Tan *et al.*, 2021). Meski demikian, kemampuan PTM-nya menjadikan HEK293A unggul untuk aplikasi farmasi, terutama dalam produksi vektor AAV untuk terapi gen maupun vaksin subunit dengan struktur yang mendekati kondisi fisiologis manusia (Jäger *et al.*, 2013; Jalsić *et al.*, 2023).

Perbandingan antara *E.coli* dan HEK293A menunjukkan bahwa keduanya memiliki peran komplementer dalam produksi protein rekombinan. *E.coli* lebih cocok

digunakan untuk produksi cepat dan ekonomis dari protein sederhana, seperti RBD SARS-CoV-2 yang digunakan untuk kebutuhan diagnostik, tetapi tidak ideal untuk protein kompleks yang memerlukan PTM untuk menjaga fungsi biologis dan imunogenisitasnya (Ooi *et al.*, 2016; L. Zhang *et al.*, 2021). Sebaliknya, HEK293A mampu menghasilkan protein dengan fungsi dan struktur yang lebih mendekati kondisi alami manusia, seperti protein transkripsi ELK-1 dengan asetilasi lisin atau VP1 yang terlikosilasi dengan afinitas reseptor 50% lebih tinggi dibandingkan hasil ekspresi di *E.coli* (Chen *et al.*, 2024; Ducker *et al.*, 2023). Dalam penelitian vaksin HFMD, *E.coli* sering digunakan untuk tahap awal screening kandidat protein subunit karena biayanya yang rendah, sedangkan HEK293A dipilih untuk tahap produksi akhir protein chimeric multi-epitope guna memastikan antigenisitas dan efikasi optimal (Huo *et al.*, 2017; Luo *et al.*, 2021). Dengan demikian, kombinasi kedua sistem ini memungkinkan strategi bertahap, *E.coli* untuk ekspresi cepat dan murah, serta HEK293A untuk produksi berkualitas tinggi yang bersama-sama mendukung pengembangan protein rekombinan di bidang riset maupun industri farmasi. Setelah proses ekspresi, tahap penting berikutnya adalah analisis protein yang dihasilkan.

2.8 Analisis Ekspresi Protein

Analisis ekspresi protein merupakan tahap penting dalam memastikan keberhasilan produksi protein rekombinan, termasuk protein chimeric multi-epitope yang dikembangkan sebagai kandidat vaksin untuk *Hand, Foot, and Mouth Disease* (HFMD). Salah satu metode utama yang digunakan adalah Western Blot, yang berfungsi untuk mendeteksi keberadaan dan ukuran molekuler protein target dalam campuran protein (Mahmood & Yang, 2012; Tie *et al.*, 2021). Prosesnya meliputi pemisahan protein menggunakan SDS-PAGE, transfer ke membran nitroselulosa atau

PVDF, dan deteksi melalui antibodi primer spesifik serta antibodi sekunder berlabel untuk visualisasi. Teknik ini efektif dalam mengonfirmasi keberhasilan ekspresi protein chimeric (Chen *et al.*, 2024; Ghaderi *et al.*, 2024). Selain deteksi kualitatif, Western Blot juga memungkinkan kuantifikasi relatif melalui analisis intensitas pita menggunakan metode densitometri atau sistem chemiluminescence dengan sensitivitas hingga 1-10 ng protein (Mishra *et al.*, 2017). Meskipun memiliki keunggulan dalam spesifisitas dan sensitivitas tinggi, teknik ini memerlukan optimasi kondisi antibodi untuk menghindari sinyal nonspesifik, yang biasanya diatasi dengan kontrol positif atau penggunaan blocking peptide (Tie *et al.*, 2021).

Immunofluorescence (IF) memberikan informasi spasial mengenai ekspresi protein di tingkat seluler, melengkapi hasil Western Blot. Teknik ini menggunakan antibodi berlabel fluoresen untuk mendeteksi protein dalam sel yang difiksasi atau hidup, sehingga memungkinkan pengamatan distribusi protein melalui mikroskop fluoresensi atau super-resolusi seperti STORM (Jones *et al.*, 2011). Dalam konteks vaksin HFMD, IF digunakan untuk memastikan lokasi ekspresi protein chimeric di membran sel, terutama untuk protein VP1 yang berinteraksi dengan reseptor imun (Luo *et al.*, 2021). HEK293A sering dipilih untuk teknik ini karena kemampuannya menghasilkan protein dengan modifikasi pasca-translasi seperti glikosilasi, yang dapat meningkatkan antigenisitas hingga 1,5-2 kali dibandingkan ekspresi di *E.coli* (Chen *et al.*, 2024). Walaupun bersifat semikuantitatif dan rentan terhadap fluoresensi latar belakang, kendala tersebut dapat diminimalkan dengan pemilihan antibodi yang selektif berdasarkan basis data seperti Antibodypedia (Tie *et al.*, 2021). Kombinasi Western Blot dan IF memberikan pemahaman menyeluruh mengenai ukuran, kuantitas,

dan distribusi protein chimeric, yang sangat penting untuk memastikan aktivitas imunogeniknya.

Tujuan utama analisis ini adalah memastikan keberhasilan ekspresi protein multi-epitope yang dirancang untuk menimbulkan respons imun silang terhadap beberapa strain enterovirus penyebab HFMD, seperti EV71 dan CVA16. Western Blot digunakan untuk mengonfirmasi ukuran dan jumlah ekspresi protein, seperti pita spesifik VP1 chimeric pada 35-40 kDa dengan yield hingga 100 mg/L di *E.coli* atau 696 mg/L di HEK293A (Chin *et al.*, 2019; Mishra *et al.*, 2017). Di sisi lain, IF berperan dalam memverifikasi lokasi ekspresi protein pada kompartemen seluler yang relevan untuk pengenalan sistem imun (Luo *et al.*, 2021). Selain itu, kedua teknik ini juga digunakan untuk menilai kualitas modifikasi pasca-translasi, seperti glikosilasi pada HEK293A, yang terbukti meningkatkan efikasi proteksi hingga lebih dari 85% dalam model hewan (Chen *et al.*, 2024). Kendala seperti sinyal nonspesifik atau variabilitas hasil dapat diminimalkan melalui optimasi protokol dengan penggunaan *lysis buffer* dengan protease inhibitor pada Western Blot atau antibodi berlabel ganda pada IF (Mahmood & Yang, 2012; Tie *et al.*, 2021). Dengan demikian, analisis ekspresi ini menjadi dasar penting dalam penelitian kloning dan ekspresi protein chimeric multi-epitope sebagai vaksin potensial untuk HFMD.

BAB III METODE PENELITIAN

3.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan studi deskriptif eksploratif yang bertujuan untuk mengkloning dan mengekspresikan protein *chimeric multi-epitope* sebagai kandidat vaksin *Hand, Foot, and Mouth Disease* (HFMD) menggunakan dua sistem ekspresi, yaitu prokariotik (*Escherichia coli* BL21) dan eukariotik (HEK293A). Rangkaian penelitian dilakukan secara bertahap, dimulai dari konstruksi plasmid rekombinan, dilanjutkan dengan transformasi ke sel inang prokariotik, serta transfeksi ke sel inang eukariotik. Proses kloning diawali dengan penyisipan gen target ke dalam vektor ekspresi, kemudian dikonfirmasi menggunakan analisis molekuler. Plasmid yang telah terverifikasi selanjutnya digunakan untuk mengekspresikan protein pada kedua sistem.. Protein yang dihasilkan kemudian dianalisis menggunakan *Western blot* untuk mengidentifikasi ukuran dan keberadaan protein target, serta uji imunofluoresensi untuk mengamati ekspresi protein pada tingkat seluler. Data yang diperoleh dianalisis secara deskriptif dengan membandingkan hasil ekspresi dari kedua sistem, sehingga dapat memberikan gambaran awal mengenai potensi produksi protein sebagai kandidat vaksin.

3.2 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan di *Laboratorium Animal Cell Culture, Biotechnology International Graduate Program, School of Bioresource and Technology, King Mongkut's University of Technology Thonburi, Thailand*. Penelitian ini dilaksanakan selama 2 bulan mulai 7 Juli 2025 sampai 27 Agustus 2025.

3.3 Alat dan Bahan

3.3.1 Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini meliputi *Laminar Air Flow* (LAF), inkubator CO₂ 5%, mikroskop *inverted*, mikroskop fluoresensi, autoklaf, oven, timbangan analitik, *water bath*, *hot plate stirrer*, *shaker incubator with thermal control*, *head-to-tail shaking*, *microcentrifuge*, centrifuge suhu berkecepatan tinggi, *freezer*, *refrigerator*, *ice box*, *thermal cycler* (C1000 Touch, Bio-Rad), *nucleic acid electrophoresis system* (Bio-Rad), *vertical gel electrophoresis system* (Bio-Rad), *gel casting tray*, *gel comb*, *gel stand*, pembaca gel elektroforesis (Azure Biosystems C Series), membran nitroselulosa, *semi-dry blotter*, pemindai hasil Western blot (Thermo Scientific Inc.), spectrophotometer NanoDrop (Thermo Scientific Inc.), *inverted fluorescence microscope* (Olympus, Japan).

Peralatan lainnya meliputi sumuran kultur (12-well plate), cawan petri, tabung erlenmeyer (250 mL dan 2 L), tabung mikro (1,5 mL), tabung sentrifugasi (15 mL dan 50 mL), kolom purifikasi, rak tabung, *sample heater*, mikropipet (0,2–1000 μ L), tip pipet steril (putih, kuning, dan biru), *beaker glass*, kalkulator, *marker pen*, plastik, karet, tisu, bunsen, jas laboratorium, sarung tangan, dan wadah limbah biologis.

3.3.2 Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini meliputi plasmid DNA pVAX1, gen chimeric multi-epitope VP1me2, kultur sel HEK293A, kultur bakteri *Escherichia coli* DH5 α dan *Escherichia coli* BL21, PCR kit (New England) yang terdiri atas Pfu PCR master mix, PCR buffer, dan dNTPs, primer forward RE-VPLE-F, primer reverse V5 (FMD)-R, enzim restriksi HindIII dan NotI, enzim ligase T4 DNA ligase, Luria-Bertani (LB) broth, LB agar, antibiotik kanamisin, IPTG (Isopropil- β -D-Thiogalactoside), *Cell*

Lytic B reagent, *lysozyme*, enzim benzonase, protease inhibitor cocktail, serta TIANprep Rapid Mini Plasmid Kit (TIANGEN).

Bahan lainnya meliputi gel agarosa, buffer TAE 1×, DNA ladder, 1× loading dye, Ethidium Bromide (EtBr), komponen SDS-PAGE (Tris-HCl, 30% bis-acrylamide, 10% SDS, 10% APS, TEMED), antibodi primer mouse anti-V5, antibodi sekunder anti-mouse IgG Alexa Fluor, larutan luminol, larutan peroksida, substrat TMB (3,3',5,5'-tetramethylbenzidine), media DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) *High Glucose*, *Fetal Bovine Serum* (FBS), antibiotik penicillin-streptomycin, *phosphate buffered saline* (PBS), *polyethylenimine* (PEI), *poly-L-lysine*, antibodi berlabel fluorokrom, DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole), RIPA buffer, TBST, DTT (dithiothreitol), imidazole, MES buffer (2-morpholinoethanesulphonic acid), susu skim 5%, trypsin, alkohol 70%, es batu, dan air.

3.4 Prosedur Penelitian

3.4.1 Preparasi Sampel Ekspresi Protein

Konstruksi gen chimeric dilakukan dengan menggunakan gen VP1me2 (~2.4 kb) yang digabungkan dengan domain Fc-V5 (~0.7 kb) sehingga menghasilkan konstruksi VP1me2-Fc dengan ukuran sekitar ~3.1 kb. Plasmid tersebut selanjutnya ditransformasikan ke dalam sistem prokariotik (*E.coli* BL21) dan ditransfeksikan ke dalam sistem eukariotik (HEK293A) untuk menghasilkan protein target. Verifikasi ekspresi protein pada *E.coli* BL21 dilakukan menggunakan metode *Western Blot*, sedangkan pada sel HEK293A dikonfirmasi melalui kombinasi *Imunofluoresens* dan *Western Blot* untuk memastikan keberadaan serta distribusi protein di dalam sel.

3.4.2 Transformasi dan Ekspresi Protein di Prokariotik (*E.coli* BL21)

Plasmid pVAX1.VP1me2-Fc yang telah diverifikasi disisipkan ke *E.coli* BL21, strain ekspresi yang membawa gen T7 DNA polimerase untuk produksi protein rekombinan. Proses *insert gene* dilakukan dengan metode *heat shock* yang sama, menggunakan 100 ng plasmid dan 50 μ L sel kompeten. Koloni yang tumbuh pada medium selektif LB broth dengan tambahan kanamisin (50 μ g/mL) diinkubasi semalam pada 37°C.

Koloni positif kemudian diinokulasi ke 5 mL medium LB cair yang mengandung kanamisin dan dikultur 16 jam pada 37°C dengan *incubator shaker* 200 rpm. Kultur starter ini digunakan untuk menginokulasi 100 mL medium LB baru, diinkubasi hingga OD600 mencapai 0.6-0.8, lalu diinduksi dengan IPTG (1 mM). Proses induksi dilakukan pada 37°C selama 24 jam.

Sel dipanen dengan sentrifugasi 8000 rpm selama 5 menit pada 4°C. Pelet sel dilisis dengan komponennya yang terdiri dari *Cell Lytic B*, *Lysozyme*, *Benzonase*, dan *Protease Inhibitor*. Selanjutnya, sampel dihomogenkan selama 15 menit menggunakan rotator, kemudian disentrifugasi pada kecepatan 12.000 rpm selama 10 menit pada suhu 4°C. Endapan sel yang terbentuk di bagian bawah tabung disebut sebagai *inclusion body*, sedangkan fraksi cair di bagian atas dikenal sebagai *soluble protein*. Kedua fraksi tersebut kemudian digunakan dalam analisis ekspresi protein menggunakan metode *Western blot*.

3.4.3 Transfeksi dan Ekspresi Protein di Eukariotik (Sel HEK293A)

Transfeksi pada sel HEK293A dilakukan untuk mengevaluasi kemampuan plasmid DNA dalam mengekspresikan protein target. Prosedur diawali dengan pembuatan media kultur berupa DMEM basal yang diperkaya dengan L-glutamine,

glukosa, sodium piruvat, HEPES, dan sodium bikarbonat. Media ini kemudian dilengkapi dengan 2% FBS serta 1% penicillin-streptomycin untuk menghasilkan DMEM komplet, lalu dialiquot sesuai kebutuhan. Sel HEK293A dikultur dalam flask T75 menggunakan DMEM komplet hingga mencapai konfluensi optimal dalam bentuk monolayer.

Setelah itu, media dibuang dan sel dicuci menggunakan PBS, kemudian dilepaskan dengan tripsin dan dinetralkan kembali menggunakan DMEM. Suspensi sel yang diperoleh selanjutnya disentrifugasi, dan pelet sel diresuspensi dalam media DMEM komplet. Untuk analisis imunofluoresensi, sumuran pada 12-well plate terlebih dahulu dilapisi dengan Poly-L-Lysin, diinkubasi, lalu dikeringkan di bawah laminar. Pelapisan ini bertujuan meningkatkan daya lekat sel pada permukaan sumuran sehingga distribusi sel lebih merata dan tidak mudah terlepas selama proses pencucian.

Sel kemudian ditanam dengan kepadatan awal rendah dan diinkubasi hingga mencapai konfluensi yang diinginkan. Transfeksi dilakukan menggunakan Polyethylenimine (PEI) sebagai agen non-viral yang membentuk kompleks dengan DNA plasmid (polyplex). Campuran ini diinkubasi terlebih dahulu pada suhu ruang, kemudian ditambahkan ke dalam kultur sel dan diinkubasi selama ± 2 jam pada suhu 37°C . Setelah itu, media diganti dengan DMEM komplet baru dan sel diinkubasi kembali selama 48 jam pada kondisi 37°C dengan 5% CO_2 . Sel hasil transfeksi selanjutnya digunakan untuk analisis ekspresi protein melalui metode imunofluoresensi dan Western blot.

3.4.4 Analisis Protein dengan Western Blot

Preparasi sampel untuk analisis *Western blot* diawali dengan pembuatan gel SDS-PAGE yang terdiri dari gel pemisah (*resolving gel*) 12% dan gel penumpuk

(*stacking gel*) 4%. Gel dibuat menggunakan campuran larutan Bis-acrylamide, Tris-HCl (pH 6,8 dan pH 8,8), SDS, APS, TEMED, dan akuades, kemudian dicetak menggunakan cetakan khusus hingga terbentuk sumuran. Sampel protein dicampur dengan *loading dye* 1X sebelum dimuat ke dalam sumuran gel. Jumlah protein yang digunakan disesuaikan dengan konsentrasi sampel, yaitu sekitar 10 µg untuk konsentrasi tinggi (>1 mg/mL) dan 1 µg untuk konsentrasi rendah (<1 mg/mL). Elektroforesis dijalankan pada tegangan 150 V selama ±50 menit hingga protein terpisah berdasarkan ukuran molekul.

Selanjutnya, protein dalam gel ditransfer ke membran menggunakan metode elektrotransfer. Gel terlebih dahulu direndam dalam *transfer buffer*, kemudian disusun bersama membran dan kertas penyerap dalam bentuk *sandwich*. Proses transfer dilakukan pada tegangan 25 V selama ±30 menit hingga protein berpindah dari gel ke membran. Membran hasil transfer selanjutnya digunakan untuk tahap analisis *Western blot*.

Setelah protein ditransfer ke membran, analisis ekspresi dilakukan menggunakan *Western blot* untuk mengevaluasi keberhasilan sistem ekspresi dalam menghasilkan protein target dari epitope VP1me dengan V5-FC. Proses diawali dengan pemisahan protein berdasarkan berat molekul menggunakan SDS-PAGE, sehingga protein dalam sampel terdistribusi sesuai ukurannya, meskipun belum teridentifikasi secara spesifik. Protein kemudian ditransfer ke membran, diikuti tahap *blocking* untuk meminimalkan ikatan non-spesifik. Selanjutnya, membran diinkubasi dengan antibodi primer (Mouse Anti-V5) yang mengenali protein target, kemudian dilanjutkan dengan antibodi sekunder (Donkey Anti-Mouse IgG) untuk proses deteksi. Visualisasi dilakukan menggunakan substrat TMB atau metode kemiluminesensi, sehingga

keberadaan protein target ditunjukkan oleh munculnya pita pada ukuran yang sesuai, yaitu sekitar 107 kDa.

Pengujian dilakukan pada dua sistem ekspresi, yaitu sel HEK293A dan *Escherichia coli* BL21, dengan pendekatan preparasi sampel yang berbeda. Pada sel HEK293A, media kultur (DMEM) dipisahkan sebagai fraksi supernatan, sedangkan sel yang menempel dipanen menggunakan RIPA buffer untuk memperoleh protein intraseluler, sehingga dihasilkan dua jenis sampel. Sementara itu, pada *E.coli* BL21, sampel yang dianalisis terdiri dari fraksi *soluble protein* dan *inclusion body* yang telah dipreparasi sebelumnya.

3.4.5 Analisis Imunofluoresens

Eksresi protein chimeric di dalam sel HEK293A diamati melalui teknik immunofluorescence staining assay yang telah ditransfeksi plasmid DNA VP1me2 dengan V5-Fc dilakukan untuk memverifikasi ekspresi protein secara langsung di dalam sel (*in situ*) melalui pengikatan antibodi spesifik. Antibodi primer (Mouse Anti-V5) berfungsi mengenali tag V5 pada protein hasil ekspresi, kemudian dideteksi oleh antibodi sekunder (Donkey Anti-Mouse IgG Alexa Fluor) yang menghasilkan sinyal fluoresensi. Pewarna DAPI turut digunakan untuk menandai inti sel dengan fluoresensi biru. Pada hasil pengamatan, sinyal biru menunjukkan keberadaan inti sel, sedangkan sinyal merah mengindikasikan ekspresi protein target yang terdeteksi secara spesifik.

Prosedur diawali dengan fiksasi sel menggunakan formaldehid 1% selama 10 menit pada suhu ruang untuk mempertahankan struktur sel, kemudian dilanjutkan dengan permeabilisasi menggunakan metanol 90% selama 5 menit pada suhu 4°C agar antibodi dapat masuk ke dalam sel. Selanjutnya, dilakukan tahap blocking menggunakan FBS 20% untuk meminimalkan ikatan non-spesifik. Sel kemudian

diinkubasi dengan antibodi primer (Mouse Anti-V5) yang diencerkan dalam PBS (1:2000) selama 2 jam pada suhu ruang, diikuti dengan inkubasi antibodi sekunder (Donkey Anti-Mouse IgG Alexa Fluor) dengan pengenceran 1:1000 selama 1 jam dalam kondisi gelap. Setelah itu, ditambahkan pewarna DAPI (1:1000) dan diinkubasi selama 15 menit. Tahap akhir dilakukan pencucian menggunakan PBS, kemudian sampel diamati menggunakan mikroskop fluoresensi. Keberhasilan ekspresi protein ditandai dengan munculnya sinyal fluoresensi merah pada sel, yang menunjukkan keberadaan protein VP1me2 yang berhasil diekspresikan.

3.4.6 Analisis Data

Tahapan analisis data dilakukan untuk memastikan keberhasilan ekspresi protein chimeric multi-epitope pada dua sistem ekspresi, yaitu prokariotik (*E.coli* BL21) dan eukariotik (HEK293A). Analisis dilakukan secara bertahap dengan membandingkan hasil Western Blot dan imunofluoresens guna menilai kesesuaian ukuran protein, keberadaan epitop spesifik, serta distribusinya di dalam sel.

Fokus utama adalah kemunculan pita protein pada ukuran yang sesuai dengan prediksi, yaitu sekitar 107 kDa dalam analisis Western Blot. Munculnya pita spesifik menunjukkan bahwa protein chimeric berhasil diekspresikan dan dapat dikenali oleh antibodi terhadap epitope VP1me2. Pada *E.coli* BL21, perbandingan antara fraksi soluble dan inclusion body digunakan untuk menilai tingkat kelarutan protein. Sementara itu, pada HEK293A dilakukan perbandingan antara fraksi supernatan dan pelet sel untuk mengetahui apakah protein diekspresikan secara intraseluler atau disekresikan. Selain itu, intensitas pita diamati secara kualitatif sebagai indikator tingkat ekspresi relatif pada masing-masing sistem.

Analisis imunofluoresens pada sel HEK293A kemudian digunakan untuk mengonfirmasi ekspresi protein secara langsung di dalam sel sekaligus melihat pola distribusinya. Keberhasilan ekspresi ditandai dengan munculnya sinyal fluoresensi merah dari antibodi terhadap tag V5, sedangkan DAPI memberikan penanda inti sel berwarna biru. Distribusi sinyal merah selanjutnya dibandingkan dengan posisi inti untuk mengidentifikasi lokasi protein, apakah berada di sitoplasma, membran, atau di sekitar nukleus.

Kombinasi hasil Western Blot dan imunofluoresens memberikan validasi yang saling melengkapi. Western Blot memastikan ukuran dan identitas protein, sedangkan imunofluoresens memperlihatkan keberadaan serta distribusi protein di dalam sel. Dengan pendekatan ini, evaluasi terhadap keberhasilan ekspresi protein chimeric pada kedua sistem dapat dilakukan secara lebih menyeluruh dan terarah.

BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1. Sistem Ekspresi Protein Rekombinan

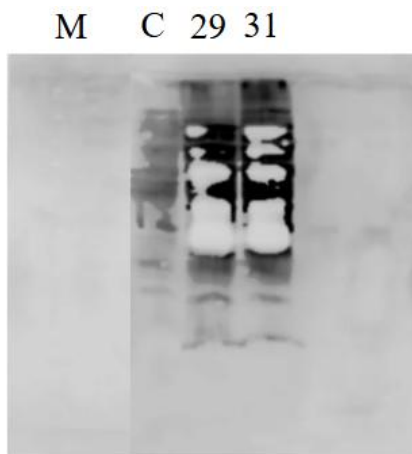
4.1.1. Ekspresi Protein pada Sistem Prokariotik (*E.coli* BL21)

Pita protein rekombinan pVAX1.VP1me2-Fc divisualisasi dengan menggunakan metode chemiluminescence belum menunjukkan pita secara jelas karena sinyal yang terlalu tinggi menyebabkan over-saturation, sehingga pita spesifik sulit dibedakan (Gambar 4.1). Visualisasi ulang dilakukan menggunakan substrat TMB menghasilkan pita protein pada ukuran sekitar 107 kDa yang tampak lebih jelas (Gambar 4.2). Kemunculan pita tersebut menunjukkan bahwa protein pVAX1.VP1me2-Fc berhasil diekspresikan pada sistem prokariotik *E.coli* BL21, meskipun pita masih tampak melebar dan sedikit difus. Pelebaran pita ini menunjukkan adanya overloading akibat jumlah protein yang dimuat terlalu tinggi (Ohara *et al.*, 2025). Selain itu, penggunaan substrat TMB membantu visualisasi pita, namun intensitas reaksi yang tinggi dapat menyebabkan pita tampak melebar, terutama pada sampel lisat kasar *E.coli* BL21 yang mengandung banyak protein non-target (Baselli *et al.*, 2025).

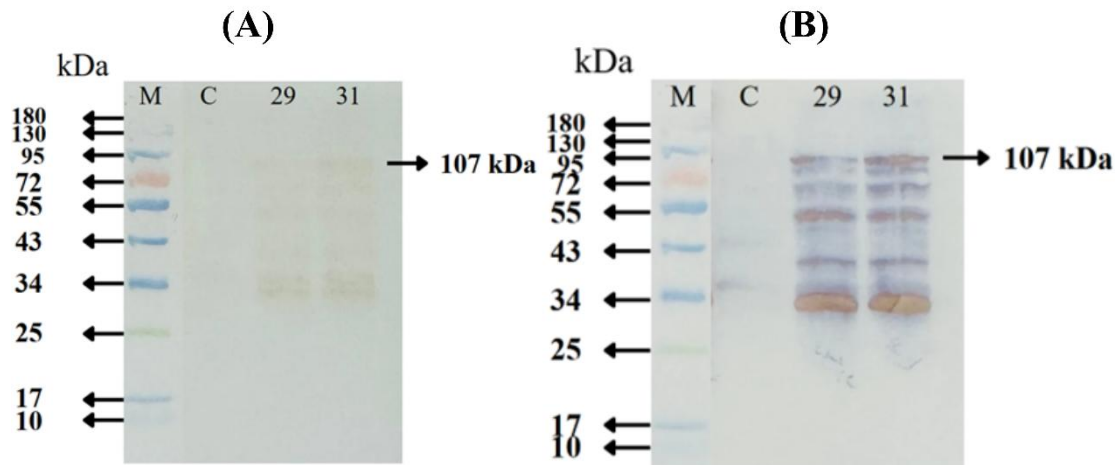
Ukuran pita yang muncul sudah sesuai dengan berat molekul teoritis protein VP1me2-Fc. Berdasarkan perhitungan menggunakan *Expasy ProtParam* dari urutan asam amino, protein VP1 memiliki berat sekitar ~36 kDa (Zhao *et al.*, 2013), kemudian ditambah enam epitope linear (Bello *et al.*, 2024), domain Fc IgG1 sekitar ~27 kDa (Ying *et al.*, 2012), serta V5-tag dan linker sekitar ~3–5 kDa. Jika dijumlahkan, totalnya mencapai sekitar 107 kDa. Kesesuaian antara berat molekul teoritis dan pita Western Blot menunjukkan bahwa protein yang terdeteksi adalah protein target yang

diharapkan. Temuan ini menandakan bahwa sistem translasi pada *E.coli* BL21 mampu mengekspresikan protein chimera berukuran besar, meskipun kualitas pelipatan proteinnya belum dapat dipastikan hanya berdasarkan analisis tersebut.

Pada penelitian ini, volume sampel dimuat ke dalam sumur gel dalam jumlah yang relatif besar untuk meningkatkan peluang deteksi protein target, mengingat konsentrasi protein rekombinan dalam lisat *E.coli* BL21 masih rendah. Kondisi ini berpotensi menyebabkan *overloading*, sehingga pita protein dapat terlihat melebar, kurang tajam, atau menyebar selama proses migrasi elektroforesis. Konsentrasi protein yang terlalu tinggi menyebabkan proses migrasi di SDS-PAGE menjadi kurang optimal sehingga pita tidak tajam. Penggunaan lisat kasar tanpa tahap pemurnian juga memungkinkan protein non-target ikut termuat ke dalam gel yang dapat menurunkan resolusi pemisahan pita protein target serta meningkatkan background selama proses deteksi Western blot (Tripathi dan Shrivastava, 2019).



Gambar 4.1 Hasil Western blot chemiluminescence protein chimeric VP1me2-Fc. Pita spesifik teramati pada ~107 kDa sesuai dengan berat molekul teoritis. M: Marker; C: Control; 29: sampel VP1me2-Fc Clone nomor 29; 31: sampel pVAX1.Vp1me2-Fc Clone nomor 31



Gambar 4.2 Hasil pewarnaan TMB pada membran Western blot protein chimeric VP1me2-Fc. (A) Before TMB (sebelum penambahan substrat TMB); (B) After TMB (setelah inkubasi substrat TMB). Pita target protein VP1me2-Fc terdeteksi pada ukuran ~107 kDa (panah hitam). M: Protein marker (kDa); C: Kontrol negatif; 29 dan 31: klon atau fraksi sampel VP1me2-Fc.

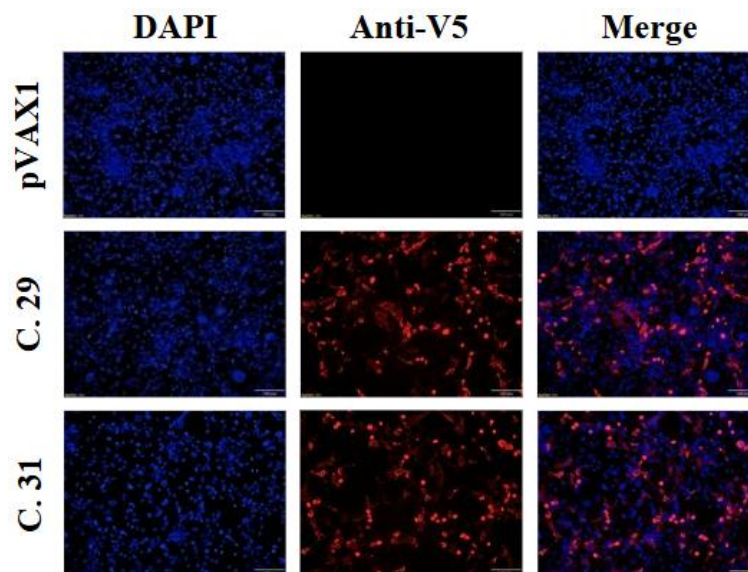
Selain pita utama, terlihat beberapa pita lain dengan ukuran lebih kecil di bagian bawah (Gambar 4.2). Pita ini kemungkinan merupakan fragmen protein yang terdegradasi atau protein lain dari *E.coli* BL21. Hal ini wajar terjadi, terutama jika sampel belum dimurnikan. Penelitian Pedroso *et al.*, (2025) juga melaporkan adanya pita tambahan disebabkan akibat pemotongan (*cleavage*) protein rekombinan dalam sistem *E.coli* BL21. Kemunculan pita berukuran lebih kecil dapat disebabkan oleh degradasi proteolitik selama proses ekspresi maupun preparasi sampel, terutama pada protein rekombinan berukuran besar yang rentan mengalami pemotongan parsial akibat pelipatan yang belum optimal (Rosano dan Ceccarelli, 2014).

Pita dengan ukuran yang sama tidak terlihat pada kontrol negatif (C), sehingga mengonfirmasi bahwa pita tersebut berasal dari ekspresi spesifik protein pVAX1.VP1me2-Fc. Hasil ini menunjukkan bahwa sistem *E.coli* BL21 mampu mengekspresikan protein VP1me2-Fc sesuai ukuran teoritis, sejalan dengan laporan

Yang *et al.*, (2023) bahwa penambahan domain Fc dapat meningkatkan ukuran protein hingga di atas 100 kDa. Namun, pita yang masih tampak difus serta munculnya fragmen protein menunjukkan bahwa ekspresi pada sistem prokariotik masih memerlukan optimasi lebih lanjut.

4.1.2. Ekspresi Protein pada Sistem Eukariotik (HEK293A)

Sinyal fluoresensi merah terdeteksi pada sel HEK293A setelah pewarnaan imunofluoresensi menggunakan antibodi anti-V5, yang menunjukkan adanya ekspresi protein pVAX1.VP1me2-Fc. Sinyal tampak tersebar di sitoplasma dengan intensitas lebih tinggi pada klon C.29 dan C.31, serta menunjukkan akumulasi di area perinuklear. Sebaliknya, pada kontrol negatif berupa sel yang ditransfeksi plasmid pVAX1 kosong tidak terdeteksi sinyal merah dan hanya terlihat inti sel berwarna biru akibat pewarnaan DAPI. Perbedaan ini menunjukkan bahwa sinyal fluoresensi yang diamati berasal dari ekspresi spesifik protein target (Gambar 4.3).



Gambar 4.3 Hasil imunofluoresensi protein chimeric VP1me2-Fc di sel HEK293A. Kolom menunjukkan pewarnaan DAPI (inti), Anti-V5 (protein target), dan Merge. Baris pVAX1 merupakan kontrol negatif, sedangkan C.29 dan C.31 adalah klon transfeksi positif. Scale bar: 20 μm .

Analisis imunofluoresensi menunjukkan bahwa sinyal protein VP1me2-Fc terdistribusi dominan di sitoplasma dan area perinuclear (Gambar 4.3), yang mengindikasikan keterlibatan jalur sintesis dan pemrosesan protein intraseluler. Pada sel mamalia, protein rekombinan disintesis di retikulum endoplasma dan diproses di aparatus Golgi sebelum disekresikan. Pola ini menunjukkan bahwa protein mengalami proses pematangan secara normal (Budge *et al.*, 2020).

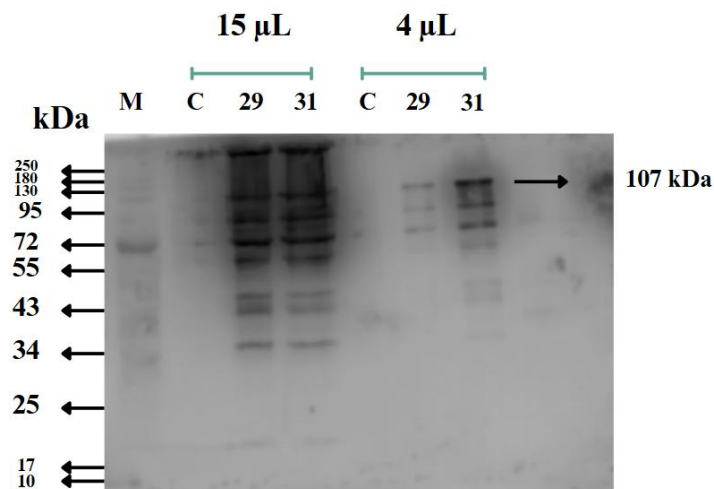
Pola distribusi sinyal yang teramati sejalan dengan laporan sebelumnya bahwa ekspresi protein berbasis pVAX1 dan deteksi menggunakan antibodi anti-V5 pada sel HEK293A menunjukkan lokalisasi di sitoplasma dan area perinuklear sebagai bagian dari jalur sekresi normal (Bello *et al.*, 2024; Zeghal *et al.*, 2023). Selain itu, keberadaan domain Fc IgG1 mendukung proses sekresi protein melalui jalur retikulum endoplasma dan aparatus Golgi. Hal ini memungkinkan protein diekspresikan secara stabil di sel mamalia (Ying *et al.*, 2012).

Penggunaan sistem HEK293A dalam pengembangan kandidat vaksin HFMD menjadi penting karena sel mamalian mampu melakukan modifikasi pasca-translasi, khususnya glikosilasi, yang menyerupai kondisi fisiologi dalam sel manusia. Hal ini membuat protein VP1me2-Fc memiliki struktur dan karakteristik yang lebih mendekati protein asli virus, sehingga berpotensi meningkatkan pengenalan oleh sistem imun (Gupta *et al.*, 2023; Sookhoo *et al.*, 2024). Dengan demikian, respons imun yang dihasilkan berpotensi lebih kuat dan lebih spesifik dibandingkan protein yang diekspresikan dalam sistem bakteri yang tidak memiliki kemampuan glikosilasi serupa.

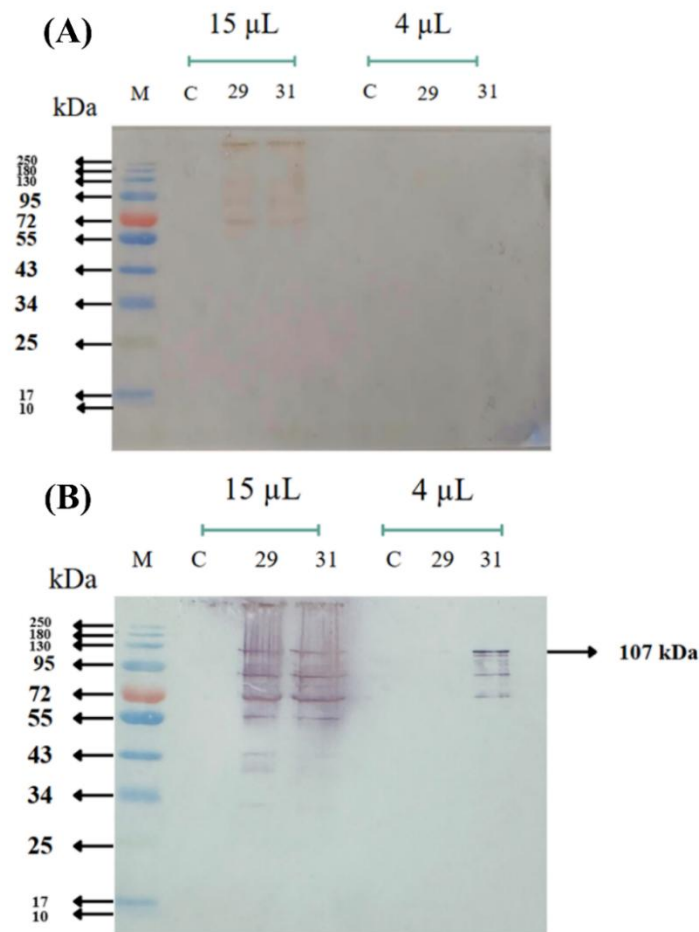
Hasil imunofluoresensi ini menunjukkan bahwa protein pVAX1.VP1me2-Fc berhasil diekspresikan di sel HEK293A dengan lokalisasi yang sesuai dan proses pematangan yang berjalan baik. Distribusi sinyal di sitoplasma dan area perinuklear

mendukung keterlibatan jalur sekresi intraseluler. Meskipun demikian, analisis lanjutan tetap diperlukan untuk mengonfirmasi ukuran dan tingkat ekspresi protein secara lebih spesifik yang dilakukan menggunakan Western blot.

Hasil Western blot menunjukkan adanya pita protein pada ukuran ~ 107 kDa pada sampel klon 29 dan 31 yang sesuai dengan berat molekul teoritis protein VP1me2-Fc. Pada deteksi chemiluminescence (Gambar 4.4), pita protein sebenarnya sudah terdeteksi, namun intensitas sinyal yang terlalu tinggi menyebabkan over-saturation sehingga detail pita sulit diamati dengan jelas. Visualisasi menggunakan substrat TMB (Gambar 4.5B) menghasilkan pita yang lebih tajam dan terdefinisi, sehingga perbedaan ekspresi antar sampel dapat diamati dengan lebih baik.



Gambar 4.4 Hasil Western blot chemiluminescence protein rekombinan pVAX1.VP1me2-Fc. Ekspresi protein terdeteksi pada ukuran molekul ~ 107 kDa menggunakan antibodi anti-Fc atau anti-VP1. Lanes: M = Marker protein (kDa), C = Kontrol negatif (sel yang ditransfeksi dengan vektor kosong pVAX1), 29 dan 31 = sampel transfeksi pVAX1.VP1me2-Fc (clone 29 dan 31). Volume loading: 15 μ L (kiri) dan 4 μ L (kanan). Deteksi menggunakan sistem chemiluminescence.



Gambar 4.5 Hasil pewarnaan TMB pada membran Western blot protein chimeric VP1me2-Fc. (A) Before TMB (sebelum penambahan substrat TMB); (B) After TMB (setelah inkubasi substrat TMB). Pita target protein VP1me2-Fc terdeteksi pada ukuran ~ 107 kDa (panah hitam). M: Protein marker (kDa); C: Kontrol negatif; 29 dan 31: klon atau fraksi sampel VP1me2-Fc.

Pada penelitian ini digunakan dua variasi volume loading sebagai bagian dari optimasi jumlah protein yang dimuat ke dalam gel. Pada kondisi loading $4 \mu\text{L}$, pita protein tampak lebih spesifik, di mana sinyal yang jelas terutama terdeteksi pada klon 31, sedangkan klon 29 dan kontrol negatif tidak menunjukkan pita yang signifikan (Gambar 4.4 dan 4.5). Hal ini menunjukkan bahwa klon 31 memiliki tingkat ekspresi yang lebih tinggi dibandingkan klon lainnya (Gambar 4.5). Perbedaan ini menunjukkan bahwa jumlah protein yang dimuat sangat memengaruhi resolusi pita, di mana loading

yang terlalu tinggi dapat menyebabkan overloading dan menurunkan kualitas pemisahan (Biotech-Pack, 2023). Oleh karena itu, penggunaan variasi volume loading dalam penelitian ini dilakukan sebagai bagian dari optimasi untuk memperoleh visualisasi protein yang lebih akurat.

Kesesuaian ukuran pita yang terdeteksi dengan berat molekul teoritis menunjukkan bahwa konstruksi gen VP1me2-Fc berhasil diekspresikan sesuai desain. Pita yang relatif jelas tanpa dominasi fragmen kecil mengindikasikan bahwa protein yang dihasilkan cukup stabil dan relatif utuh pada sistem HEK293A (Gambar 4.5). Sedikit pelebaran pita kemungkinan berkaitan dengan modifikasi pasca-translasi, seperti glikosilasi, yang umum terjadi pada sistem eukariotik dan dapat memengaruhi migrasi protein pada SDS-PAGE, sejalan dengan laporan sebelumnya (Song *et al.*, 2023). Hasil ini juga konsisten dengan laporan sebelumnya bahwa protein fusi VP1-Fc pada sistem eukariotik dapat terdeteksi secara jelas dan sesuai ukuran yang diprediksi (Park *et al.*, 2025; Le *et al.*, 2025).

4.1.3. Perbandingan Sistem Ekspresi Prokariotik dan Eukariotik

Protein rekombinan VP1me2-Fc diekspresikan menggunakan dua sistem berbeda, yaitu sistem prokariotik (*Escherichia coli* BL21) dan sistem eukariotik (sel mamalia HEK293A), untuk membandingkan performa ekspresi dan kualitas protein yang dihasilkan. Kedua sistem mampu mengekspresikan protein dengan ukuran yang sesuai dengan berat molekul teoritis, sehingga menunjukkan bahwa konstruksi gen berhasil diterjemahkan. Namun, perbedaan kualitas ekspresi terlihat jelas antara kedua sistem tersebut.

Pada sistem prokariotik, protein dapat diproduksi secara efisien, tetapi menunjukkan kualitas pita yang kurang tajam serta adanya indikasi fragmen protein,

yang mencerminkan keterbatasan dalam pelipatan dan stabilitas protein. Sebaliknya, sistem eukariotik HEK293A menghasilkan pita yang lebih tajam, spesifik, dan relatif minim degradasi, sehingga menunjukkan bahwa protein berada dalam kondisi yang lebih stabil dan terlipat dengan baik. Perbedaan ini menegaskan bahwa kualitas protein yang dihasilkan pada sistem eukariotik lebih baik dibandingkan sistem prokariotik.

Perbedaan tersebut berkaitan dengan kemampuan sel dalam melakukan modifikasi pascatranslasi. Sel eukariotik memiliki organel seperti retikulum endoplasma dan aparatus Golgi yang berperan dalam pelipatan, pematangan, dan modifikasi protein, termasuk glikosilasi yang berkontribusi terhadap stabilitas dan karakteristik struktural protein (Schütz *et al.*, 2023; Sookhoo *et al.*, 2024). Sebaliknya, sistem prokariotik tidak memiliki mekanisme tersebut, sehingga protein lebih rentan mengalami kesalahan pelipatan atau membentuk agregat (Hasegawa *et al.*, 2023).

Selain itu, variasi tingkat ekspresi juga terlihat antar klon pada sistem HEK293A. Klon C.31 menunjukkan intensitas pita Western blot yang lebih tinggi dibandingkan klon C.29, terutama pada kondisi loading 4 μ L di mana pita yang jelas hanya terdeteksi pada klon C.31. Hal ini menunjukkan bahwa meskipun menggunakan konstruksi gen yang sama, efisiensi ekspresi masih dipengaruhi oleh karakteristik masing-masing klon.

Secara keseluruhan, sistem *Escherichia coli* BL21 unggul dalam efisiensi produksi awal, sedangkan sistem HEK293A lebih optimal dalam menghasilkan protein dengan kualitas yang lebih baik dan stabil. Dalam pengembangan vaksin rekombinan, pemilihan sistem ekspresi dan klon dengan tingkat ekspresi tinggi menjadi faktor penting untuk tahap lanjutan (Avello *et al.*, 2024). Oleh karena itu, klon C.31 pada sistem HEK293A dipilih sebagai kandidat terbaik untuk tahap analisis lanjutan.

4.2. Integrasi Sains dan Perspektif Islam terhadap Penelitian Pengembangan Vaksin Rekombinan VP1me2-Fc

Penelitian ini berhasil mengembangkan protein rekombinan VP1me2-Fc sebagai kandidat antigen vaksin untuk penyakit Hand, Foot, and Mouth Disease (HFMD) melalui dua sistem ekspresi, yaitu prokariotik (*E.coli*) dan eukariotik (HEK293A). Dari perspektif Islam, upaya ini dapat dipahami sebagai bentuk ikhtiar manusia dalam mengatasi masalah kesehatan, sekaligus memanfaatkan ilmu pengetahuan untuk kemaslahatan umat dan menjaga kehidupan (hifzh al-nafs). Islam mendorong manusia untuk terus mencari solusi atas penyakit. Hal ini sejalan dengan firman Allah SWT pada QS. Al-Baqarah [2]: 269 :

يُؤْتِي الْحِكْمَةَ مَنْ يَشَاءُ ۚ وَمَنْ يُؤْتَ الْحِكْمَةَ فَقَدْ أُوتِيَ خَيْرًا كَثِيرًا ۗ وَمَا يَذَّكَّرُ إِلَّا أُولُو الْأَلْبَابِ ﴿٢٦٩﴾
(البقرة/2: 269)

Artinya: *Dia (Allah) menganugerahkan hikmah kepada siapa yang Dia kehendaki. Siapa yang dianugerahi hikmah, sungguh dia telah dianugerahi kebaikan yang banyak. Tidak ada yang dapat mengambil pelajaran (darinya), kecuali ululalbab. (Al-Baqarah/2:269)*

Ayat ini menunjukkan bahwa kemampuan manusia dalam rekayasa genetik dan pengembangan protein rekombinan merupakan bagian dari hikmah yang diberikan Allah. (Kashim *et al.*, 2022) menjelaskan bahwa pengembangan vaksin rekombinan untuk mencegah penyakit berbahaya termasuk bentuk pemanfaatan ilmu yang sejalan dengan *maqasid syariah*, khususnya dalam menjaga jiwa. Ilmu seperti rekombinan DNA dipandang sebagai kebaikan yang diberikan Allah selama prosesnya memenuhi prinsip kehalalan. Selain itu, Allah juga berfirman dalam QS. An-Nahl [16]: 18 yang berbunyi :

وَأَنْ تَعُدُّوا نِعْمَةَ اللَّهِ لَا تُحْصُوهَا إِنَّ اللَّهَ لَغَفُورٌ رَحِيمٌ ﴿١٨﴾ (النحل/16: 18)

Artinya: “*Jika kamu menghitung nikmat Allah, niscaya kamu tidak akan mampu menghitungnya. Sesungguhnya Allah benar-benar Maha Pengampun lagi Maha Penyayang.*” (An-Nahl/16:18)

Ayat ini mengingatkan bahwa kemajuan sains, termasuk kemampuan merekayasa protein melalui bakteri dan sel mamalia, merupakan nikmat yang perlu dimanfaatkan secara bijak. (Kashim *et al.*, 2022) juga menegaskan bahwa vaksin rekombinan adalah salah satu bentuk pemanfaatan nikmat tersebut untuk mencegah penyebaran penyakit, sehingga selaras dengan upaya menjaga kesehatan masyarakat. Dari sisi hukum Islam, Komisi Fatwa Majelis Ulama Indonesia (2022) melalui Fatwa No. 9 Tahun 2022 menyatakan bahwa penggunaan gen sintetik dan rekombinan DNA untuk pembuatan obat dan vaksin hukumnya boleh (mubah), selama tidak berasal dari bahan yang haram atau najis. Hal ini menunjukkan bahwa pengembangan vaksin rekombinan, seperti dalam penelitian ini, diperbolehkan dan bahkan dianjurkan selama bertujuan menjaga keselamatan manusia.

Terdapat beberapa hikmah dari temuan penelitian ini. *Pertama*, penyakit seperti HFMD dapat dipahami sebagai ujian, namun di saat yang sama Allah juga memberikan jalan untuk mencari pencegahannya melalui ilmu pengetahuan. *Kedua*, penelitian ini memiliki tujuan yang jelas untuk melindungi manusia, terutama anak-anak, dari risiko penyakit yang dapat menimbulkan komplikasi serius. *Ketiga*, pemanfaatan sistem biologis seperti *E.coli* dan sel HEK293A dalam menghasilkan antigen vaksin dapat dilihat sebagai bentuk pemanfaatan ciptaan Allah secara bertanggung jawab dan bernilai ibadah.

Temuan ini juga didukung oleh (Kashim *et al.*, 2022) dalam penelitiannya yang menyimpulkan bahwa vaksin rekombinan penting dalam mencegah penyebaran virus berbahaya dan sesuai dengan prinsip *maqasid syariah*. Penelitian tersebut menegaskan

bahwa pengembangan vaksin yang halal dan aman merupakan bagian dari ikhtiar ilmiah yang dibenarkan dalam Islam. Penelitian ini tidak hanya memberikan kontribusi dalam bidang sains, tetapi juga menunjukkan bahwa perkembangan ilmu pengetahuan dapat berjalan selaras dengan nilai-nilai Islam. Pemanfaatan teknologi rekombinan untuk menghasilkan vaksin menjadi salah satu bentuk usaha nyata dalam menjaga kesehatan masyarakat. Semakin dalam ilmu dipelajari, semakin terlihat bahwa sains dan agama dapat saling melengkapi dalam memberikan manfaat bagi kehidupan manusia.

Penelitian pengembangan vaksin rekombinan VP1me2-Fc menunjukkan adanya keselarasan antara inovasi bioteknologi modern dengan prinsip-prinsip Islam. Berbeda dengan pendekatan vaksin konvensional yang umumnya bersifat reaktif dan bergantung pada patogen yang dilemahkan, penelitian ini mengembangkan antigen secara lebih terkontrol dan efisien melalui dua sistem ekspresi, yaitu prokariotik (*E. coli*) dan eukariotik (HEK293A). Pendekatan ini tidak hanya berkontribusi dalam pengembangan ilmu pengetahuan, tetapi juga secara langsung menjawab permasalahan kesehatan masyarakat, khususnya penyakit Hand, Foot, and Mouth Disease (HFMD) yang banyak menyerang anak-anak. Selain itu, penelitian ini juga berorientasi pada pemenuhan kebutuhan umat dengan menghadirkan alternatif vaksin yang lebih aman serta berpotensi memenuhi aspek kehalalan.

Dari sisi kehalalan, seluruh proses penelitian ini tidak melibatkan bahan yang bersifat haram atau najis. Sistem ekspresi *E.coli* merupakan mikroorganisme yang umum digunakan dan tidak termasuk kategori najis, sementara sel lini HEK293A telah dinyatakan mubah berdasarkan Fatwa MUI Nomor 56 Tahun 2023 karena tidak termasuk bagian tubuh manusia yang dilarang. Bahan pendukung lainnya, seperti

media kultur, enzim, dan vektor, juga berasal dari sumber nabati, kimia, maupun sintetik yang bebas dari unsur haram. Hal ini sejalan dengan Fatwa Majelis Ulama Indonesia Nomor 4 Tahun 2021 yang menyatakan bahwa penggunaan gen sintetik dan rekombinan DNA dalam pembuatan vaksin hukumnya mubah selama tidak berasal dari bahan yang haram atau najis. Dengan demikian, penelitian ini tidak hanya memenuhi aspek ilmiah, tetapi juga selaras dengan ketentuan syariat Islam.

Lebih jauh, penelitian ini dapat dipandang sebagai bentuk ikhtiar ilmiah yang diarahkan untuk meraih ridha Allah SWT melalui kontribusi nyata dalam menjaga kesehatan masyarakat. Ridwan (2023) menyatakan bahwa vaksinasi sebagai upaya pencegahan penyakit merupakan bagian dari pemenuhan *maqasid syariah*, khususnya dalam menjaga jiwa (*hifz al-nafs*). Sejalan dengan itu, Sahidin & Muslih (2022) menegaskan bahwa pengembangan sains dalam perspektif Islam harus berorientasi pada *maqasid syariah* sebagai wujud integrasi antara ilmu pengetahuan dan nilai keagamaan. Oleh karena itu, penelitian ini tidak hanya berfungsi sebagai capaian akademik, tetapi juga sebagai bentuk pengabdian yang memiliki dimensi spiritual.

Secara keseluruhan, penelitian VP1me2-Fc tidak hanya memberikan kontribusi ilmiah dalam bidang pengembangan vaksin, tetapi juga memperkuat integrasi nilai-nilai Islam dalam teknologi kesehatan. Penelitian ini mencerminkan upaya menumbuhkembangkan ilmu pengetahuan, menyelesaikan permasalahan kesehatan, serta melayani kebutuhan umat, yang pada akhirnya diarahkan sebagai bentuk ikhtiar untuk meraih ridha Allah SWT. Dengan demikian, penelitian ini memiliki nilai kemaslahatan yang luas dan sejalan dengan prinsip *maqasid syariah*.

BAB V PENUTUP

5.1 Kesimpulan

Kesimpulan penelitian ini menunjukkan bahwa konstruksi pVAX1-VP1me2-Fc berhasil mengekspresikan protein rekombinan VP1me2-Fc pada sistem prokariotik *Escherichia coli* BL21 dan sistem eukariotik sel mamalia HEK293A, yang dibuktikan melalui analisis immunofluorescence (IF) dan Western blot, serta berpotensi untuk penelitian lanjutan kandidat vaksin. Berdasarkan hasil tersebut, clone 31 menunjukkan tingkat ekspresi protein yang lebih dominan dibandingkan clone lainnya.

5.2 Saran

Saran pada penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Penelitian selanjutnya dapat dilakukan analisis kuantitatif terhadap tingkat ekspresi protein rekombinan melalui analisis densitometri pada hasil Western blot untuk memperoleh data ekspresi protein yang lebih akurat.
2. Perlu dilakukan analisis terhadap protein yang disekresikan ke dalam medium kultur sel, mengingat konstruksi VP1me2-Fc memiliki domain Fc yang berpotensi meningkatkan sekresi protein melalui jalur sekretori sel mamalia.
3. Penelitian lanjutan dapat dilakukan untuk mengevaluasi potensi imunogenisitas protein VP1me2-Fc melalui uji imunologi seperti ELISA, guna menilai kemampuannya sebagai kandidat antigen dalam pengembangan vaksin terhadap penyakit *Hand, Foot, and Mouth Disease*.

DAFTAR PUSTAKA

- Adedokun, K. A., Adekola, S. A., Tajudeen, A., Bello-Ibiyemi, A. A., Babandina, M. M., Magwe, E. A., & Bello, A. (2025). Rising global threat of human metapneumovirus (hMPV in 2024/2025): pathogenesis, immune dynamics, vulnerabilities in immunocompromised individuals, and lessons from past pandemics. In *Journal of Rare Diseases (Germany)* (Vol. 4, Number 1). Springer Science and Business Media Deutschland GmbH. <https://doi.org/10.1007/s44162-025-00079-w>
- Al-Madhagi, H., Kanawati, A., & Tahan, Z. (2024). Design of multi-epitope chimeric vaccine against Monkeypox virus and SARS-CoV-2: A vaccinomics perspective. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 28(10). <https://doi.org/10.1111/jcmm.18452>
- Andongma, B. T., Huang, Y., Chen, F., Tang, Q., Yang, M., Chou, S. H., Li, X., & He, J. (2023). In silico design of a promiscuous chimeric multi-epitope vaccine against Mycobacterium tuberculosis. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 21, 991–1004. <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2023.01.019>
- Avello, V., Salazar, S., González, E. E., Campos, P., Manríque, V., Mathieu, C., Hugues, F., Cabezas, I., Gädicke, P., Parra, N. C., Acosta, J., Sánchez, O., González, A., & Montesino, R. (2024). Recombinant Subunit Vaccine Candidate against the Bovine Viral Diarrhea Virus. *International Journal of Molecular Sciences*, 25(16). <https://doi.org/10.3390/ijms25168734>
- Baselli, S., Corsa, M., Bregoli, A., Zanetti, B., Castelli, A., Hoffmann, B., Milovanović, M., & Pezzoni, G. (2025). Two proteins, one goal: ELISAs based on p32 and L1R for LSDV antibodies detection. *Frontiers in Veterinary Science*, 12. <https://doi.org/10.3389/fvets.2025.1695369>
- Bello, M. A., Chaimongkolnukul, K., Poomputsa, K., Mekvichitsaeng, P., & Maprang Roshorm, Y. (2024). Immunogenicity and immunodominant linear B-cell epitopes of a new DNA-based tetravalent vaccine against four major enteroviruses causing hand, foot, and mouth disease. *Vaccine*, 42(17), 3733–3743. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2024.04.087>
- Budge, J. D., Knight, T. J., Povey, J., Roobol, J., Brown, I. R., Singh, G., Dean, A., Turner, S., Jaques, C. M., Young, R. J., Racher, A. J., & Smales, C. M. (2020). Engineering of Chinese hamster ovary cell lipid metabolism results in an expanded ER and enhanced recombinant biotherapeutic protein production. *Metabolic Engineering*, 57, 203–216. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2019.11.007>
- Celie, P. H. N., Parret, A. H. A., & Perrakis, A. (2016). Recombinant cloning strategies for protein expression. In *Current Opinion in Structural Biology* (Vol. 38, pp. 145–154). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2016.06.010>
- Chen, W., Zhang, K., Huang, F., Zhao, L., Waldren, G. C., Jiang, Q., Chen, S. X., Wang, B., Guo, W., Zhang, D. Y., & Zhang, J. X. (2024). Advancing quantitative PCR with color cycle multiplex amplification. *Nucleic Acids Research*, 52(17), e81. <https://doi.org/10.1093/nar/gkae683>
- Chen, X., Zhang, Y., Mao, N., Zhu, S., Ji, T., & Xu, W. (2019). Intranasal immunization with coxsackievirus A16 virus-like particles confers protection against lethal

- infection in neonatal mice. *Archives of Virology*, 164(12), 2975–2984. <https://doi.org/10.1007/s00705-019-04418-3>
- Chen, Y. A., Shen, Y. S., Fang, C. Y., Chan, T. T., Wu, S. R., Wang, J. R., Wu, S. C., & Liu, C. C. (2024). Enhanced production of recombinant coxsackievirus A16 using a serum-free HEK293A suspension culture system for bivalent enterovirus vaccine development. *Vaccine*, X, 20. <https://doi.org/10.1016/j.jvacx.2024.100559>
- Chi, F., Zhang, X., Zhang, D., Zhu, A., Zhuang, Z., Zhang, Z., Zhang, Z., Quan, C., Nie, K., Li, J., Yin, C., Tong, J., & Li, Y. (2025). A nucleoside-modified mRNA vaccine prevents enterovirus A71 infection in mouse model. *Frontiers in Immunology*, 16. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2025.1535758>
- Chin, C. L., Goh, J. B., Srinivasan, H., Liu, K. I., Gowher, A., Shanmugam, R., Lim, H. L., Choo, M., Tang, W. Q., Tan, A. H. M., Nguyen-Khuong, T., Tan, M. H., & Ng, S. K. (2019). A human expression system based on HEK293 for the stable production of recombinant erythropoietin. *Scientific Reports*, 9(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-019-53391-z>
- Chong, P., Hsieh, S. Y., Liu, C. C., Chou, A. H., Chang, J. Y., Wu, S. C., Liu, S. J., Chow, Y. H., Su, I. J., & Klein, M. (2012). Production of EV71 vaccine candidates. In *Human Vaccines and Immunotherapeutics* (Vol. 8, Number 12, pp. 1775–1783). <https://doi.org/10.4161/hv.21739>
- Dai, B., Chen, Y., Han, S., Chen, S., Wang, F., Feng, H., Zhang, X., Li, W., Chen, S., Yang, H., Duan, G., Li, G., & Jin, Y. (2024). Epidemiology and etiology of hand, foot, and mouth disease in Zhengzhou, China, from 2009 to 2021. *Infectious Medicine*, 3(2). <https://doi.org/10.1016/j.imj.2024.100114>
- Deng, H., Yu, S., Guo, Y., Gu, L., Wang, G., Ren, Z., Li, Y., Li, K., & Li, R. (2020). Development of a multivalent enterovirus subunit vaccine based on immunoinformatic design principles for the prevention of HFMD. *Vaccine*, 38(20), 3671–3681. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2020.03.023>
- Dong, C., Wang, J., Liu, L., Zhao, H., Liao, Y., Shi, H., Zhang, Y., Jiang, L., & Li, Q. (2010). Optimized development of a candidate strain of inactivated EV71 vaccine and analysis of its immunogenicity in rhesus monkeys. *Human Vaccines*, 6(12), 1028–1037. <https://doi.org/10.4161/hv.6.12.12982>
- Ducker, C., Ratnam, M., Shaw, P. E., & Layfield, R. (2023). Comparative analysis of protein expression systems and PTM landscape in the study of transcription factor ELK-1. *Protein Expression and Purification*, 203. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2022.106216>
- Durocher, Y., & Butler, M. (2009). Expression systems for therapeutic glycoprotein production. In *Current Opinion in Biotechnology* (Vol. 20, Number 6, pp. 700–707). <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2009.10.008>
- Ghaderi, H., Shoari, A., Salehi, S., Eskafi, A. H., Habibi-Anbouhi, M., Cohan, R. A., Moazzami, R., & Behdani, M. (2024). *Expression and purification of SARS-CoV-2 receptor binding domain in Escherichia coli for diagnostic and therapeutic purposes.*
- Gholami, S., Gheibi, N., Falak, R., & Goodarzvand, K. (2018). Cloning, Expression, Purification and CD Analysis of Recombinant Human Betatrophin. In *Reports of Biochemistry & Molecular Biology* (Vol. 6, Number 2). www.RBMB.net

- Guo, J., Cao, Z., Liu, H., Xu, J., Zhao, L., Gao, L., Zuo, Z., Song, Y., Han, Z., Zhang, Y., & Wang, J. (2022). Epidemiology of hand, foot, and mouth disease and the genetic characteristics of Coxsackievirus A16 in Taiyuan, Shanxi, China from 2010 to 2021. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, *12*. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2022.1040414>
- Gupta, R., Arora, K., Roy, S. S., Joseph, A., Rastogi, R., Arora, N. M., & Kundu, P. K. (2023). Platforms, advances, and technical challenges in virus-like particles-based vaccines. In *Frontiers in Immunology* (Vol. 14). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1123805>
- Hasegawa, H., Wang, S., Kast, E., Chou, H.-T., Kaur, M., Janlaor, T., Mostafavi, M., Wang, Y.-L., & Li, P. (2023). *Understanding the biosynthesis of human IgMs through a combinatorial expression of mutant subunits that affect different assembly steps*. <https://doi.org/10.1101/2023.09.01.555973>
- He, X., Zhang, M., Zhao, C., Zheng, P., Zhang, X., & Xu, J. (2021). From Monovalent to Multivalent Vaccines, the Exploration for Potential Preventive Strategies Against Hand, Foot, and Mouth Disease (HFMD). In *Virologica Sinica* (Vol. 36, Number 2, pp. 167–175). Science Press. <https://doi.org/10.1007/s12250-020-00294-3>
- Hu, Q., Xie, Y., Ji, F., Zhao, F., Song, X., Lu, S., Li, Z., Geng, J., Yang, H., Long, J., Jin, Y., Chen, S., & Duan, G. (2024). Effectiveness of EV-A71 Vaccine and Its Impact on the Incidence of Hand, Foot and Mouth Disease: A Systematic Review. In *Vaccines* (Vol. 12, Number 9). Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI). <https://doi.org/10.3390/vaccines12091028>
- Huang, C. Y., Su, S. Bin, & Chen, K. T. (2024a). A review of enterovirus-associated hand-foot and mouth disease: preventive strategies and the need for a global enterovirus surveillance network. In *Pathogens and Global Health* (Vol. 118, Numbers 7–8, pp. 538–548). Taylor and Francis Ltd. <https://doi.org/10.1080/20477724.2024.2400424>
- Huang, C. Y., Su, S. Bin, & Chen, K. T. (2024b). A review of enterovirus-associated hand-foot and mouth disease: preventive strategies and the need for a global enterovirus surveillance network. In *Pathogens and Global Health* (Vol. 118, Numbers 7–8, pp. 538–548). Taylor and Francis Ltd. <https://doi.org/10.1080/20477724.2024.2400424>
- Huo, C., Yang, J., Lei, L., Qiao, L., Xin, J., & Pan, Z. (2017). Hepatitis B virus core particles containing multiple epitopes confer protection against enterovirus 71 and coxsackievirus A16 infection in mice. *Vaccine*, *35*(52), 7322–7330. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2017.10.101>
- Itmam, M. S. (2022). Kehalalan Vaksinasi Perspektif Politik Hukum. *Al-Manahij: Jurnal Kajian Hukum Islam*, *16*(1). <https://doi.org/10.24090/mnh.v16i1.6301>
- Jäger, V., Büssow, K., Wagner, A., Weber, S., Hust, M., Frenzel, A., & Schirrmann, T. (2013). High level transient production of recombinant antibodies and antibody fusion proteins in HEK293 cells. *BMC Biotechnology*, *13*. <https://doi.org/10.1186/1472-6750-13-52>
- Jalšić, L., Lytvyn, V., Elahi, S. M., Hrapovic, S., Nassoury, N., Chahal, P. S., Gaillet, B., & Gilbert, R. (2023). Inducible HEK293 AAV packaging cell lines expressing Rep proteins. *Molecular Therapy Methods and Clinical Development*, *30*, 259–275. <https://doi.org/10.1016/j.omtm.2023.07.002>

- Jartti, M., Flodström-Tullberg, M., & Hankaniemi, M. M. (2024). Enteroviruses: epidemic potential, challenges and opportunities with vaccines. In *Journal of Biomedical Science* (Vol. 31, Number 1). BioMed Central Ltd. <https://doi.org/10.1186/s12929-024-01058-x>
- Jones, S. A., Shim, S. H., He, J., & Zhuang, X. (2011). Fast, three-dimensional super-resolution imaging of live cells. *Nature Methods*, 8(6), 499–505. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1605>
- Kanse, S., Khandelwal, M., Pandey, R. K., Khokhar, M., Desai, N., & Kumbhar, B. V. (2023). Designing a Multi-Epitope Subunit Vaccine against VP1 Major Coat Protein of JC Polyomavirus. *Vaccines*, 11(7). <https://doi.org/10.3390/vaccines11071182>
- Kashim, M. I. A. M., Mohamad, M. N., Safri, L. S., Hasim, N. A., & Mokhtar, M. H. & S. M. H. (2022). Status of Vaccines Derived from Al-Najs in Islamic Perspective. *International Journal of Academic Research in Progressive Education and Development*, 1(1), 662–676. <https://doi.org/10.6007/IJARPED/v11-i1/12255>
- Kattur Venkatachalam, A. R., Szyport, M., Kiener, T. K., Balraj, P., & Kwang, J. (2014). Concentration and purification of enterovirus 71 using a weak anion-exchange monolithic column. *Virology Journal*, 11(1). <https://doi.org/10.1186/1743-422X-11-99>
- Khoiri, N., & Nasution, A. (2022). MUI Legal Fatwa on Vaccine Halalness in COVID-19 Vaccination Socialization in Medan City, Indonesia. *Al-Manahij: Jurnal Kajian Hukum Islam*, 16(1), 15–28. <https://doi.org/10.24090/mnh.v16i1.5146>
- Koh, W. M., Bogich, T., Siegel, K., Jin, J., Chong, E. Y., Tan, C. Y., Chen, M. I. C., Horby, P., & Cook, A. R. (2016). The epidemiology of hand, foot and mouth disease in Asia: A systematic review and analysis. In *Pediatric Infectious Disease Journal* (Vol. 35, Number 10, pp. e285–e300). Lippincott Williams and Wilkins. <https://doi.org/10.1097/INF.0000000000001242>
- Kuijpers, L., van den Braak, W. J. P., Freydoonian, A., Dekker, N. H., & van der Pol, L. A. (2025). Optimization of Enterovirus-like Particle Production and Purification Using Design of Experiments. *Pathogens*, 14(2). <https://doi.org/10.3390/pathogens14020118>
- Le, N. M. T., Chun, J., Ko, Y. H., & Kim, D. H. (2025). Cell surface display of VP1 of foot-and-mouth disease virus on *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbial Cell Factories*, 24(1). <https://doi.org/10.1186/s12934-025-02872-0>
- Li, H. Y., Han, J. F., Qin, C. F., & Chen, R. (2013). Virus-like particles for enterovirus 71 produced from *Saccharomyces cerevisiae* potentially elicits protective immune responses in mice. *Vaccine*, 31(32), 3281–3287. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2013.05.019>
- Li, J., Ju, Y., Jiang, M., Li, S., & Yang, X. Y. (2025). Epitope-Based Vaccines: The Next Generation of Promising Vaccines Against Bacterial Infection. In *Vaccines* (Vol. 13, Number 3). Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI). <https://doi.org/10.3390/vaccines13030248>
- Li, J., Liu, G., Liu, X., Yang, J., Chang, J., Zhang, W., & Yu, X. F. (2015). Optimization and characterization of candidate strain for coxsackievirus A16 inactivated vaccine. *Viruses*, 7(7), 3891–3909. <https://doi.org/10.3390/v7072803>

- Liang, L., Zhang, Y., Zhang, X., Guo, X., & Yan, Y. (2025). Historical evolution, research hotspots and emerging trends of pediatric hand, foot, and mouth disease: a bibliometric worldview since the 21st century. In *Frontiers in Medicine* (Vol. 12). Frontiers Media SA. <https://doi.org/10.3389/fmed.2025.1722750>
- Liu, F., Yi, Y., Song, Y., Zhang, X., Xie, T., Liu, Y., Chen, Y., Huang, S., Zhang, J., Zhang, Y., Chang, Z., & Cui, F. (2025). Epidemiology of hand, foot, and mouth disease outbreaks before and during availability of EV-A71 vaccine in China's mainland: analysis of outbreak surveillance data from 2011 to 2023. *The Lancet Regional Health - Western Pacific*, 59. <https://doi.org/10.1016/j.lanwpc.2025.101603>
- Liu, Q., Liu, M., Liang, W., Li, X., Jing, W., Chen, Z., & Liu, J. (2025). Global distribution and health impact of infectious disease outbreaks, 1996–2023: a worldwide retrospective analysis of World Health Organization emergency event reports. *Journal of Global Health*, 15. <https://doi.org/10.7189/jogh.15.04151>
- Liu, Y., Maisimu, M., Ge, Z., Xiao, S., & Wang, H. (2025). The Pathogenesis and Virulence of the Major Enterovirus Pathogens Associated with Severe Clinical Manifestations: A Comprehensive Review. In *Cells* (Vol. 14, Number 20). Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI). <https://doi.org/10.3390/cells14201617>
- Lozano Terol, G., Gallego-Jara, J., Sola Martínez, R. A., Martínez Vivancos, A., Cánovas Díaz, M., & de Diego Puente, T. (2021a). Impact of the Expression System on Recombinant Protein Production in Escherichia coli BL21. *Frontiers in Microbiology*, 12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.682001>
- Lozano Terol, G., Gallego-Jara, J., Sola Martínez, R. A., Martínez Vivancos, A., Cánovas Díaz, M., & de Diego Puente, T. (2021b). Impact of the Expression System on Recombinant Protein Production in Escherichia coli BL21. *Frontiers in Microbiology*, 12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.682001>
- Luo, J., Huo, C., Qin, H., Hu, J., Lei, L., & Pan, Z. (2021). Chimeric enterovirus 71 virus-like particle displaying conserved coxsackievirus A16 epitopes elicits potent immune responses and protects mice against lethal EV71 and CA16 infection. *Vaccine*, 39(30), 4135–4143. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2021.05.093>
- Mahmood, T., & Yang, P. C. (2012). Western blot: Technique, theory, and trouble shooting. *North American Journal of Medical Sciences*, 4(9), 429–434. <https://doi.org/10.4103/1947-2714.100998>
- Majelis Ulama Indonesia. (2022). *PRODUK VAKSIN COVID-19 DARI BEIJING INSTITUTE OF BIOLOGICAL PRODUCTS CO., LTD.* (Nomor : 9 Tahun 2022). chrome-extension://efaidnbmnnnibpcajpcglclefindmkaj/<https://fatwamui.com/storage/317/Fatwa-MUI-Nomor-9-Tahun-2022-tentang-Produk-Vaksin-Covid-19-dari-Beijing-Institute-of-Biological-Products-Co.,-Ltd..pdf>
- Mao, Q. Y., Wang, Y., Bian, L., Xu, M., & Liang, Z. (2016). EV71 vaccine, a new tool to control outbreaks of hand, foot and mouth disease (HFMD). In *Expert Review of Vaccines* (Vol. 15, Number 5, pp. 599–606). Taylor and Francis Ltd. <https://doi.org/10.1586/14760584.2016.1138862>
- Meng, T., Kiener, T. K., & Kwang, J. (2012). RNA polymerase I-driven reverse genetics system for enterovirus 71 and its implications for vaccine production. *Virology Journal*, 9. <https://doi.org/10.1186/1743-422X-9-238>

- Mishra, M., Tiwari, S., & Gomes, A. V. (2017). Protein purification and analysis: Next generation western blotting techniques. In *Expert Review of Proteomics* (Vol. 14, Number 11, pp. 1037–1053). Taylor and Francis Ltd. <https://doi.org/10.1080/14789450.2017.1388167>
- Mortazavi, B., Molaei, A., & Fard, N. A. (2024). Multi-epitope vaccines, from design to expression; an in silico approach. In *Human Immunology* (Vol. 85, Number 3). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/j.humimm.2024.110804>
- Nasution, M. M. (2020). *VAKSINASI DALAM PERSPEKTIF ISLAM*.
- Niu, Z., Zhao, J., Dou, K., Liu, K., Xu, M., Li, M., Cui, X., Bai, R., Zheng, M., & Lv, X. (2026). The construction of recombinant DNA vaccine pVAX-ROP27-IL-2-IFN- γ and its immune enhancement effect against *Eimeria tenella*. *Poultry Science*, 106466. <https://doi.org/10.1016/j.psj.2026.106466>
- Ohara, A., Pengyue, Z., Cao, X., Donini, R., Haslam, S. M., & Polizzi, K. M. (2025). The Impact of Methanol Concentration on Recombinant Protein Glycosylation in *Pichia pastoris* SuperMan5. *Microbial Biotechnology*, 18(12). <https://doi.org/10.1111/1751-7915.70272>
- Ojima, Y., Saito, H., Miyuki, S., Fukunaga, K., Tsuboi, T., & Azuma, M. (2025). Induction conditions that promote the effect of glycerol on recombinant protein production in *Escherichia coli*. *Biotechnology Reports*, 46. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2025.e00898>
- Ooi, A., Wong, A., Esau, L., Lemtiri-Chlieh, F., & Gehring, C. (2016). A guide to transient expression of membrane proteins in HEK-293 cells for functional characterization. *Frontiers in Physiology*, 7(JUL). <https://doi.org/10.3389/fphys.2016.00300>
- Park, J. Y., Lee, H. M., Kang, K. J., Jung, M. K., Mun, J. Y., Kim, M. J., Pyun, J. C., Hwang, S. Y., Park, J. H., & Shin, H. J. (2025). Development and immunogenicity of adenoviral Fc-fused FMDV virus-like particle vaccine in swine. *Veterinary Quarterly*, 45(1). <https://doi.org/10.1080/01652176.2025.2564443>
- Pedroso, A., Miranda, J., Lefin, N., Effer, B., Reyanldo, E. P., Calle, Y., Monteiro, G., Pessoa, A., & Farias, J. G. (2025). Toward Safer Biotherapeutics: Expression and Characterization of a Humanized Chimeric L-Asparaginase in *E. coli*. *International Journal of Molecular Sciences*, 26(14). <https://doi.org/10.3390/ijms26146919>
- Pereira, I. B., & Khan, A. (2017). Sarcoidosis rare cutaneous manifestations: Vulval and perianal involvement. *Journal of Obstetrics and Gynaecology*, 37(4), 539–540. <https://doi.org/10.1080/01443615.2016.1256964>
- Ren, J., Wang, X., Zhu, L., Hu, Z., Gao, Q., Yang, P., Li, X., Wang, J., Shen, X., Fry, E. E., Rao, Z., & Stuart, D. I. (2015). Structures of Coxsackievirus A16 Capsids with Native Antigenicity: Implications for Particle Expansion, Receptor Binding, and Immunogenicity. *Journal of Virology*, 89(20), 10500–10511. <https://doi.org/10.1128/jvi.01102-15>
- Rosano, G. L., & Ceccarelli, E. A. (2014). Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: Advances and challenges. In *Frontiers in Microbiology* (Vol. 5, Number APR). Frontiers Research Foundation. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00172>




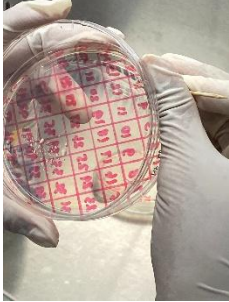


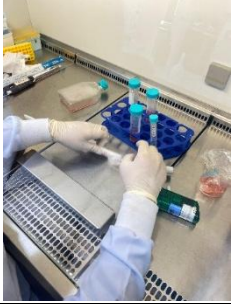
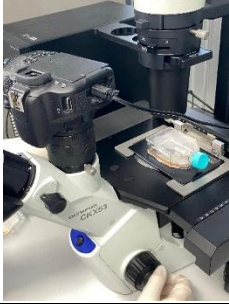
- Safrida, Aksa, F. N., & Saifullah. (2022). Tinjauan Hukum Islam Terhadap Fatwa MUI NO 02 Tahun 2021 Tentang Kehalalan Vaksin Covid-19 Sinovac. *Jurnal Ilmiah Mahasiswa Fakultas Hukum (JIM FH)*, *V(2)*.
- Schütz, A., Bernhard, F., Berrow, N., Buyel, J. F., Ferreira-da-Silva, F., Haustraete, J., van den Heuvel, J., Hoffmann, J. E., de Marco, A., Peleg, Y., Suppmann, S., Unger, T., Vanhoucke, M., Witt, S., & Remans, K. (2023). A concise guide to choosing suitable gene expression systems for recombinant protein production. In *STAR Protocols* (Vol. 4, Number 4). Cell Press. <https://doi.org/10.1016/j.xpro.2023.102572>
- Sharma, S., Sharan, U., Kaur, R., Chaudhary, A., Rawat, S. S., Keshri, A. K., Arora, N., & Prasad, A. (2024). An inclusive approach to designing a multi-epitope chimeric vaccine for Taenia infections by integrating proteomics and reverse vaccinology. *Frontiers in Tropical Diseases*, *5*. <https://doi.org/10.3389/fitd.2024.1393570>
- Siddiki, A. Z., Alam, S., Fuad Bin Hossen, F., & Alim, M. A. (2025). Development of a multi-epitope chimeric vaccine in silico against Babesia bovis, Theileria annulata, and Anaplasma marginale using computational biology tools and reverse vaccinology approach. *PLoS ONE*, *20(1)* (January). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0312262>
- Song, L., Zhang, Y., Wang, Y., Xia, Q., Guo, D., Cao, J., Xin, X., Cheng, H., Liu, C., Jia, X., & Li, F. (2023). Detection of various fusion genes by one-step RT-PCR and the association with clinicopathological features in 242 cases of soft tissue tumor. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, *11*. <https://doi.org/10.3389/fcell.2023.1214262>
- Sookhoo, J. R. V., Schiffman, Z., Ambagala, A., Kobasa, D., Pardee, K., & Babiuk, S. (2024a). Protein Expression Platforms and the Challenges of Viral Antigen Production. In *Vaccines* (Vol. 12, Number 12). Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI). <https://doi.org/10.3390/vaccines12121344>
- Sookhoo, J. R. V., Schiffman, Z., Ambagala, A., Kobasa, D., Pardee, K., & Babiuk, S. (2024b). Protein Expression Platforms and the Challenges of Viral Antigen Production. In *Vaccines* (Vol. 12, Number 12). Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI). <https://doi.org/10.3390/vaccines12121344>
- Tan, E., Chin, C. S. H., Lim, Z. F. S., & Ng, S. K. (2021). HEK293 Cell Line as a Platform to Produce Recombinant Proteins and Viral Vectors. In *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* (Vol. 9). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2021.796991>
- Tie, L., Xiao, H., Wu, D. lei, Yang, Y., & Wang, P. (2021). A brief guide to good practices in pharmacological experiments: Western blotting. In *Acta Pharmacologica Sinica* (Vol. 42, Number 7, pp. 1015–1017). Springer Nature. <https://doi.org/10.1038/s41401-020-00539-7>
- Wu, B., Zhang, X., Fu, M., & Ji, X. (2025). Epidemiological trends of hand, foot, and mouth disease in children under age 10, Jiangning District, Jiangsu, China (2009–2023). *BMC Infectious Diseases*, *25(1)*. <https://doi.org/10.1186/s12879-025-11281-y>
- Wu, P., Li, X., Yang, M., Huang, Z., Mo, H., Li, T., Zhang, Y., & Li, H. (2018). High-throughput, one-step screening, cloning and expression based on the lethality of DpnI in Escherichia coli. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *504(1)*, 177–183. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2018.08.151>

- Wu, Y., Zhu, R., Xu, L., Li, Y., Li, S., Yu, H., Li, S., Zhu, H., Cheng, T., & Xia, N. (2017). A novel combined vaccine based on monochimeric VLP co-displaying multiple conserved epitopes against enterovirus 71 and varicella-zoster virus. *Vaccine*, *35*(20), 2728–2735. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2017.03.065>
- Xie, Z., Khamrin, P., Maneekarn, N., & Kumthip, K. (2024a). Epidemiology of Enterovirus Genotypes in Association with Human Diseases. In *Viruses* (Vol. 16, Number 7). Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI). <https://doi.org/10.3390/v16071165>
- Xie, Z., Khamrin, P., Maneekarn, N., & Kumthip, K. (2024b). Epidemiology of Enterovirus Genotypes in Association with Human Diseases. In *Viruses* (Vol. 16, Number 7). Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI). <https://doi.org/10.3390/v16071165>
- Xing, W., Liao, Q., Viboud, C., Zhang, J., Sun, J., Wu, J. T., Chang, Z., Liu, F., Fang, V. J., Zheng, Y., Cowling, B. J., Varma, J. K., Farrar, J. J., Leung, G. M., & Yu, H. (2014). Hand, foot, and mouth disease in China, 2008–12: An epidemiological study. *The Lancet Infectious Diseases*, *14*(4), 308–318. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(13\)70342-6](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(13)70342-6)
- Yang, T., Xie, T., Song, X., Shen, D., Li, H., Yue, L., Jiang, Q., Zhu, F., Meng, H., Long, R., Yang, R., Luo, F., & Xie, Z. (2020). Safety and immunogenicity of an experimental live combination vaccine against enterovirus 71 and coxsackievirus A16 in rhesus monkeys. *Human Vaccines and Immunotherapeutics*, *16*(7), 1586–1594. <https://doi.org/10.1080/21645515.2019.1709353>
- Yang, Y., Xia, Q., Zhou, L., Zhang, Y., Guan, Z., Zhang, J., Li, Z., Liu, K., Li, B., Shao, D., Qiu, Y., Ma, Z., & Wei, J. (2023). B602L-Fc fusion protein enhances the immunogenicity of the B602L protein of the African swine fever virus. *Frontiers in Immunology*, *14*. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1186299>
- Yee, P. T. I., & Poh, C. L. (2018). T cell immunity to enterovirus 71 infection in humans and implications for vaccine development. In *International Journal of Medical Sciences* (Vol. 15, Number 11, pp. 1143–1152). Ivyspring International Publisher. <https://doi.org/10.7150/ijms.26450>
- Ying, T., Chen, W., Gong, R., Feng, Y., & Dimitrov, D. S. (2012a). Soluble monomeric IgG1 Fc. *Journal of Biological Chemistry*, *287*(23), 19399–19408. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.368647>
- Ying, T., Chen, W., Gong, R., Feng, Y., & Dimitrov, D. S. (2012b). Soluble monomeric IgG1 Fc. *Journal of Biological Chemistry*, *287*(23), 19399–19408. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.368647>
- Zahid, L. (2024). The Role of Hadith in Islamic Medical Ethics. *Kurdish Studies*, 186–192. <https://doi.org/10.53555/ks.v12i3.3016>
- Zeghal, M., Matte, K., Venes, A., Patel, S., Laroche, G., Sarvan, S., Joshi, M., Rain, J. C., Couture, J. F., & Giguère, P. M. (2023). Development of a V5-tag-directed nanobody and its implementation as an intracellular biosensor of GPCR signaling. *Journal of Biological Chemistry*, *299*(9). <https://doi.org/10.1016/j.jbc.2023.105107>
- Zhang, C., Ku, Z., Liu, Q., Wang, X., Chen, T., Ye, X., Li, D., Jin, X., & Huang, Z. (2015). High-yield production of recombinant virus-like particles of enterovirus 71 in *Pichia pastoris* and their protective efficacy against oral viral challenge in mice. *Vaccine*, *33*(20), 2335–2341. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2015.03.034>

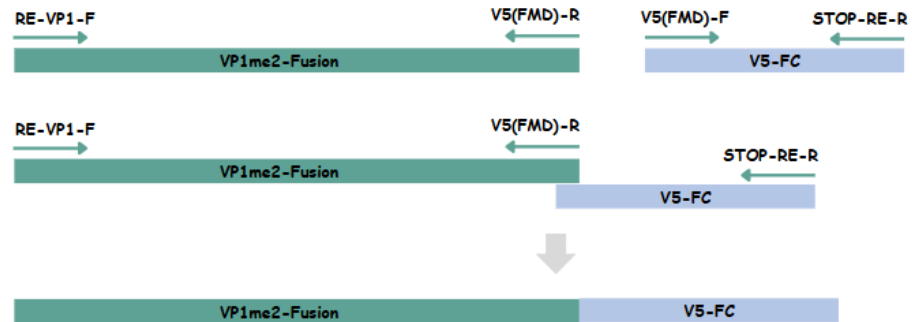
- Zhang, D., Zou, Y., Wu, J., Xu, L., Ke, Z., Wu, Y., Zhou, Z., Fang, M., Chen, L., Xu, H., Chu, J., Xia, N., Zhu, R., & Cheng, T. (2025). Construction of a Vero cell line expression human KREMEN1 for the development of CVA6 vaccines. *Virology Journal*, 22(1). <https://doi.org/10.1186/s12985-024-02618-1>
- Zhang, L., Lin, X., Wang, T., Guo, W., & Lu, Y. (2021). Development and comparison of cell-free protein synthesis systems derived from typical bacterial chassis. *Bioresources and Bioprocessing*, 8(1). <https://doi.org/10.1186/s40643-021-00413-2>
- Zhang, X., Zhang, Y., Li, H., & Liu, L. (2023). Hand-Foot-and-Mouth Disease-Associated Enterovirus and the Development of Multivalent HFMD Vaccines. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 24, Number 1). MDPI. <https://doi.org/10.3390/ijms24010169>
- Zhao, H., Li, H. Y., Han, J. F., Deng, Y. Q., Li, Y. X., Zhu, S. Y., He, Y. L., Qin, E. De, Chen, R., & Qin, C. F. (2013a). Virus-like particles produced in *Saccharomyces cerevisiae* elicit protective immunity against Coxsackievirus A16 in mice. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97(24), 10445–10452. <https://doi.org/10.1007/s00253-013-5257-3>
- Zhao, H., Li, H. Y., Han, J. F., Deng, Y. Q., Li, Y. X., Zhu, S. Y., He, Y. L., Qin, E. De, Chen, R., & Qin, C. F. (2013b). Virus-like particles produced in *Saccharomyces cerevisiae* elicit protective immunity against Coxsackievirus A16 in mice. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97(24), 10445–10452. <https://doi.org/10.1007/s00253-013-5257-3>

LAMPIRAN

Lampiran 1 Dokumen Penelitian

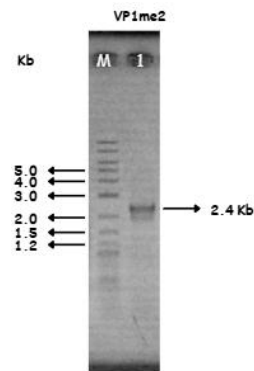
	
Proses pemotongan hasil PCR overlapping	Pebuatan LB Broth
	
Proses mentranfer vector ke <i>E.coli</i>	Proses penanaman bakteri dengan system grid
	
Proses Rapid Size Screening	Proses ekspresi protein
	
Proses penanaman sel HEK293A	Proses pengamatan dengan metode immunofluorescence staining assay

Lampiran 2 Desain Konstruksi Genetik pVAX1.VP1me2-Fc

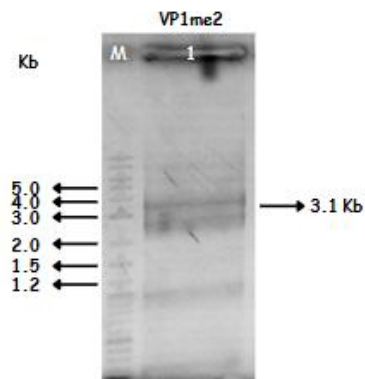


Lampiran 3 Proses Konstruksi Genetik pVAX1.VP1me2-Fc

a. Hasil PCR Amplifikasi dari VP1



b. Hasil Overlapping PCR VP1me2-Fc



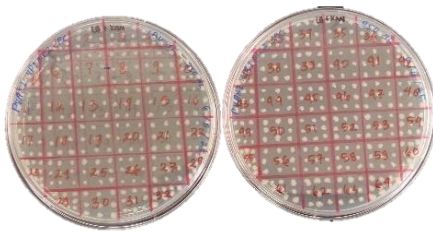
- c. Hasil ligasi pada dua plate seleksi untuk memperoleh koloni transforman.



150 μ L

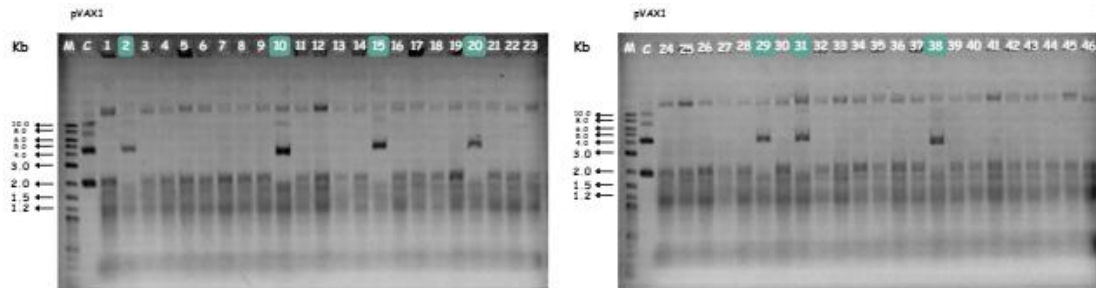
850 μ L

- d. Hasil *master plate* sebagai stok koloni hasil ligasi yang berhasil tumbuh pada media selektif.

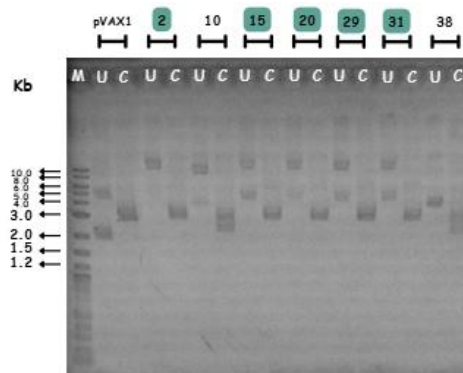


Lampiran 4 Proses Rapid Size Screening dan Konfirmasi

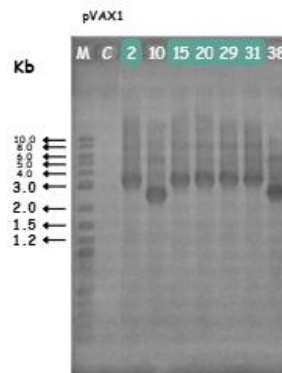
- a. Hasil Rapid Size Screening



- b. Hasil Konfirmasi Menggunakan *Enzyme Digest Assay*



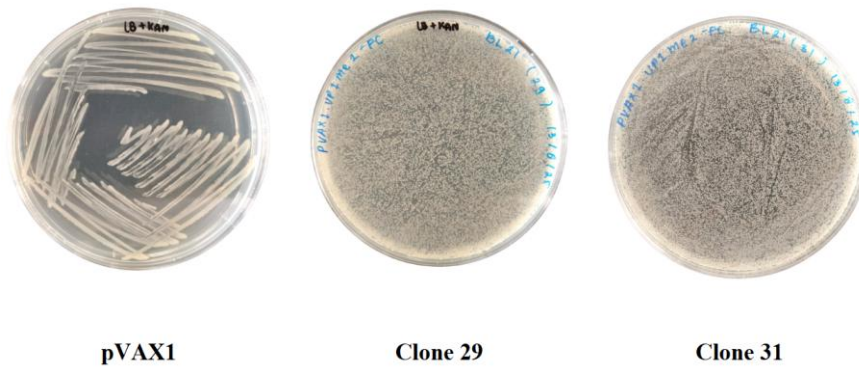
c. Hasil Konfirmasi Menggunakan PCR



d. Hasil Konsentrasi Positif Koloni

Clone	Consentrasion
2	376 ng/ μ L
10	284.4 ng/ μ L
15	378 ng/ μ L
20	343.6 ng/ μ L
29	437.6 ng/ μ L
31	509.8 ng/ μ L
38	247.5 ng/ μ L

Lampiran 5 Hasil Transformasi Plasmid Rekombinan ke Sel E.coli BL21



pVAX1

Clone 29

Clone 31

Lampiran 6 Data Pengukuran Optical Density (OD) Kultur Bakteri Sebelum Induksi

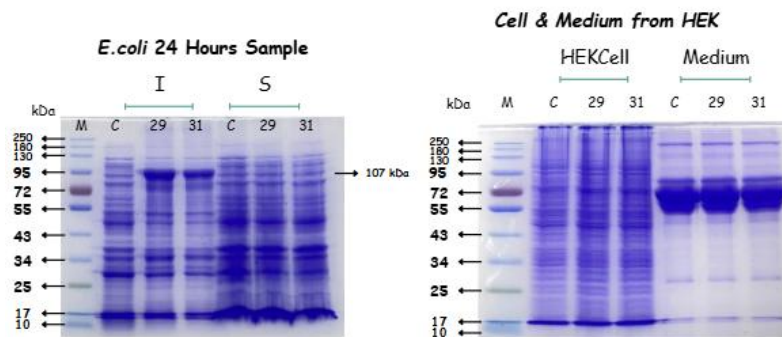
Time	Plasmid Clone			Clock	Remind volume
	pVAX1	Clone 29	Clone 31		
2 hours	0.220	0.166	0.071	10.45	24 mL
1 hours	0.430	0.380	0.281	11.45	23 mL
30 min	0.586	0.545	0.391	12.15	22 mL
30 min			0.584	12.45	21 mL

Lampiran 7 Data Pengukuran Optical Density (OD) Setelah Penambahan IPTG

Time	Plasmid Clone			Clock	Remind volume
	pVAX1	Clone 29	Clone 31		
24 hours	1.024	1.248	1.392	12.30 & 12.50	19 mL & 20 mL

Lampiran 8 Protein Hasil Lisis Sel Menggunakan CellLytic™ B

24 Hours IPTG Induction						
Protein Name	Soluble Protein			Inclusion Bodies Protein		
	Conc. (mg/mL)	Volumn (mL)	Total Amount (mg)	Conc. (mg/mL)	Volumn (mL)	Total Amount (mg)
pVAX1	7.710	1.63	12.56	6.936	1.6	11.09
VP1me2-Fc C.29	8.604	1.63	14.02	3.550	1.6	5.68
VP1me2-Fc C.31	8.285	1.63	13.46	2.938	1.6	4.70

Lampiran 9 Hasil SDS-PAGE pada E.coli BL21 dan HEK293a sistem



JURNAL BIMBINGAN SKRIPSI/TESIS/DISERTASI

IDENTITAS MAHASISWA

NIM : 220602110090
Nama : FARADILA ZAHROTUL NUR AZIZAH
Fakultas : SAINS DAN TEKNOLOGI
Jurusan : BIOLOGI
Dosen Pembimbing 1 : Dr. KIPTIYAH, M.Si
Dosen Pembimbing 2 : Dr. M. MUKHLIS FAHRUDDIN, M.S.I
Judul Skripsi/Tesis/Disertasi : Kloning dan Ekspresi Protein Chimera Multi-Epitop untuk Produksi Vaksin HFMD pada Sistem E.coli dan HEK293A

IDENTITAS BIMBINGAN

No	Tanggal Bimbingan	Nama Pembimbing	Deskripsi Proses Bimbingan	Tahun Akademik	Status
1	29 Agustus 2025	Dr. KIPTIYAH, M.Si	Bimbingan Judul Penelitian	Ganjil 2025/2026	Sudah Dikoreksi
2	05 September 2025	Dr. KIPTIYAH, M.Si	ACC Judul Penelitian	Ganjil 2025/2026	Sudah Dikoreksi
3	12 September 2025	Dr. KIPTIYAH, M.Si	Bimbingan Bab 1, 3	Ganjil 2025/2026	Sudah Dikoreksi
4	19 September 2025	Dr. KIPTIYAH, M.Si	ACC Bab 1, 3 dan Bimbingan Bab 2	Ganjil 2025/2026	Sudah Dikoreksi
5	26 September 2025	Dr. KIPTIYAH, M.Si	Bimbingan Bab 2	Ganjil 2025/2026	Sudah Dikoreksi
6	29 September 2025	Dr. M. MUKHLIS FAHRUDDIN, M.S.I	Bimbingan agama ayat dan tafsir	Ganjil 2025/2026	Sudah Dikoreksi
7	03 Oktober 2025	Dr. KIPTIYAH, M.Si	ACC Bab 2	Ganjil 2025/2026	Sudah Dikoreksi
8	14 Oktober 2025	Dr. M. MUKHLIS FAHRUDDIN, M.S.I	ACC Bimbingan Agama	Ganjil 2025/2026	Sudah Dikoreksi
9	02 Maret 2026	Dr. KIPTIYAH, M.Si	Konsultasi Bab IV dan V	Genap 2026/2027	Sudah Dikoreksi
10	04 Maret 2026	Dr. KIPTIYAH, M.Si	Revisi Bab IV dan V	Genap 2026/2027	Sudah Dikoreksi
11	11 Maret 2026	Dr. M. MUKHLIS FAHRUDDIN, M.S.I	Konsultasi Integrasi Bab IV	Genap 2026/2027	Sudah Dikoreksi
12	12 Maret 2026	Dr. M. MUKHLIS FAHRUDDIN, M.S.I	Revisi Integrasi Bab IV	Genap 2026/2027	Sudah Dikoreksi

Telah disetujui
Untuk mengajukan ujian Skripsi/Tesis/Desertasi

Dosen Pembimbing 2

Dr. M. MUKHLIS FAHRUDDIN, M.S.I



Malang, _____
Dosen Pembimbing 1

Dr. KIPTIYAH, M.Si



KEMENTERIAN AGAMA
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI MAULANA MALIK IBRAHIM MALANG
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI
PROGRAM STUDI BIOLOGI

Jl. Gajayana No. 50 Malang 65144 Telp./ Faks. (0341) 558933
Website: <http://biologi.uin-malang.ac.id> Email: biologi@uin-malang.ac.id

Form Checklist Plagiasi

Nama : Faradila Zahrotul Nur Azizah
NIM : 220602110090
Judul : Kloning dan Ekspresi Protein Chimera Multi-Epitope sebagai Kandidat Vaksin Penyakit (HFMD) menggunakan Sistem E.Coli dan HEK293A

No	Tim Check plagiasi	Skor Plagiasi	TTD
1	Azizatur Rohmah, M.Sc		
2	Berry Fakhry Hanifa, M.Sc		
3	Bayu Agung Prahardika, M.Si		
4	Tyas Nyonita Punjungsari, M.Sc		
5	Maharani Retna Duhita, M.Sc., PhD.Med.Sc	5/6	

Mengetahui,
Ketua Program Studi Biologi



Prof. Dr. Retno Susilowati, M.Si
NIP. 19671113 199402 2 001