

**KONSTRUKSI DAN EKSPRESI PROTEIN KAPSID *Porcine Circovirus 3*
(PCV3) SEBAGAI KANDIDAT DALAM PRODUKSI VAKSIN SUBUNIT
SECARA IN VITRO**

SKRIPSI



OLEH:

MUHAMMAD AZKA SHAFARA ZAIN

NIM. 220602110031

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

**KONSTRUKSI DAN EKSPRESI PROTEIN KAPSID *Porcine Circovirus 3*
(PCV3) SEBAGAI KANDIDAT DALAM PRODUKSI VAKSIN SUBUNIT
SECARA IN VITRO**

SKRIPSI

OLEH:

MUHAMMAD AZKA SHAFARA ZAIN

NIM. 220602110031

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

LEMBAR PENGESAHAN

Skripsi ini diajukan oleh :

Nama : Muhammad Azka Shafara Zain

NIM : 220602110131

Program Studi : Biologi

Judul Skripsi : KONSTRUKSI DAN EKSPRESI PROTEIN
KAPSID *Porcine Circovirus* 3 (PCV3) SEBAGAI
KANDIDAT DALAM PRODUKSI VAKSIN
SUBUNIT SECARA IN VITRO

Telah berhasil dipertahankan di hadapan Dewan Penguji pada tanggal 29 April 2026 dan diterima sebagai bagian persyaratan yang diperlukan untuk memperoleh gelar Sarjana pada Program Studi Biologi, Fakultas Sains dan Teknologi, Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.

DEWAN PENGUJI

Pembimbing I : Kholifah Holil, M.Si

(.....K.....)

Pembimbing II : Didik Wahyudi, M.Si

(.....Didik.....)

Tim Penguji : Dr. Kiptiyah, M.Si

(Ketua) (.....Kiptiyah.....)

Maharani Retna Duhita, M.Sc.,
Ph.D.Med.Sc.

(Anggota) (.....Retna.....)



Ketua Program Studi Biologi

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

HALAMAN PERSEMBAHAN

Bismillahirrahmanirrahim

Dengan menyebut nama Allah Subhanahu wa ta'ala yang maha pengasih lagi maha penyayang. Alhamdulillah puji syukur kami panjatkan ke hadirat Allah *Subhanahu wa ta'ala*, yang telah melimpahkan rahmat, hidayah, dan inayat-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan tugas akhir dalam bentuk skripsi. Shalawat serta salam semoga senantiasa terlimpah curahkan kepada Nabi Muhammad SAW. Skripsi ini saya persembahkan kepada pihak-pihak yang telah membantu, memberi motivasi, semangat, serta doa kepada penulis selama penyusunan skripsi ini, yaitu khususnya kepada:

1. Diri saya sendiri yang telah bertahan hingga saat ini, terima kasih karena tidak menyerah dan terus optimis dalam menyelesaikan tugas akhir ini.
2. Abah Muhammad Khoerun Zain, Umi Innarotun Nafi'ah, Kakak Inna Firiana Zain, Adek Muhammad Zaka Aufa Zain, dan Adek Muhammad 'Aidin Faiz Haitami Zain yang dengan cinta, doa, dan pengorbanan tiada henti menjadi sumber kekuatan dan inspirasi dalam setiap langkah.
3. Teman-teman seperjuangan di Pondok Pesantren Darul Qur'an Wa Tahfidz (Daqizh) Malang yang telah memberikan dukungan mental berupa hiburan dalam keseharian serta kebersamaan dalam suka dan duka sehingga dalam menjalani kehidupan sehari-hari selalu diselimuti dengan kehangatan nuansa kekeluargaan pesantren. Terkhusus kepada Ustadz Abdul Rozaq, M.Ag yang telah banyak memberikan inspirasi dan wawasan keilmuannya serta bimbingan dalam kehidupan sosial serta keseimbangannya dengan kehidupan spiritual.
4. Teman-teman (BIO Cerdas, Rajin, Oke, Terampil, Terdepan, dan Terbaik) Rendha Maulana Haritzah, M. Achsan Hari Wijaya, Muhammad Lamalif Asyabilyamin, Erlangga Bayu Permana, Muhammad Faqih Al-Muhtadi, dan Ari Sulaiman yang selalu memberikan semangat, yang selalu bergotong-royong dalam kesuksesan perkuliahan, yang selalu bersama berjuang menjadi mahasiswa yang berkompetensi, yang selalu bertukar cerita, yang selalu hadir ketika ada problematika yang menimpa.

5. Teman-teman Kelas Biologi-Corsa serta seluruh teman-teman angkatan Raventalizm'22 yang senantiasa selalu kebersamai setiap prosesnya dan selalu memberikan dukungan serta doa satu sama lain.
6. NIM 220602110034 yang senantiasa kebersamai dan memberikan tempat untuk berkeluh kesah sehingga penulis hingga saat ini dapat menyelesaikan tugas akhir sebagaimana mestinya.
7. Seluruh pihak yang terlibat dan tidak dapat disebutkan namanya secara personal yang telah memberikan dukungan secara teknis, moral, maupun mental sehingga skripsi ini dapat terselesaikan.

Malang, 29 April 2026



Muhammad Azka Shafara Zain

MOTTO

أَمَّنْ هُوَ قَانَتْ أُنَاءَ اللَّيْلِ سَاجِدًا وَقَائِمًا يَحْذَرُ الْآخِرَةَ وَيَرْجُوا رَحْمَةَ رَبِّهِ قُلْ هَلْ يَسْتَوِي الَّذِينَ يَعْلَمُونَ وَالَّذِينَ لَا يَعْلَمُونَ إِنَّمَا يَتَذَكَّرُ أُولُوا الْأَلْبَابِ

“(Apakah orang musyrik yang lebih beruntung) ataukah orang yang beribadah pada waktu malam dalam keadaan bersujud, berdiri, takut pada (azab) akhirat, dan mengharapkan rahmat Tuhannya? Katakanlah (Nabi Muhammad), “Apakah sama orang-orang yang mengetahui (hak-hak Allah) dengan orang-orang yang tidak mengetahui (hak-hak Allah)?” Sesungguhnya hanya ululalbab (orang yang berakal sehat) yang dapat menerima pelajaran.” (QS. Az-Zumar [39]:9)

PERNYATAAN KEASLIAN TULISAN

Saya yang bertanda tangan dibawah ini:

Nama : Muhammad Azka Shafara Zain
NIM : 220602110031
Program Studi : Biologi
Fakultas : Sains dan Teknologi
Judul Penelitian : Konstruksi dan Ekspresi Protein Kapsid *Porcine Circovirus*
3 (PCV3) Sebagai Kandidat dalam Produksi Vaksin Subunit
Secara In Vitro

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 dikemudian hari terbukti atau dapat dibuktikan skripsi ini hasil jiplakan, maka saya bersedia menerima sanksi akademik maupun hukum atas perbuatan tersebut.

Malang, 29 April 2026
Yang membuat pernyataan



Muhammad Azka Shafara Zain
NIM. 220602110031

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.

KONSTRUKSI DAN EKSPRESI PROTEIN KAPSID *Porcine Circovirus 3* (PCV3) SEBAGAI KANDIDAT DALAM PRODUKSI VAKSIN SUBUNIT SECARA IN VITRO

Muhammad Azka Shafara Zain, Kholifah Holil, Didik Wahyudi

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

ABSTRAK

Babi merupakan komoditas peternakan dengan nilai ekonomi dan permintaan pasar yang tinggi pada beberapa negara industri babi. Namun, babi rentan terhadap penyakit yang menyebabkan kerugian, salah satunya yaitu infeksi virus *Porcine circovirus 3* (PCV3). PCV3 secara khusus menginfeksi saluran pernafasan dan organ dalam hingga dapat menyebabkan komplikasi pada babi. Penelitian ini bertujuan untuk mengkonstruksi gen ORF2 (gen yang mengkode protein kapsid) dan menguji ekspresinya dengan metode *Immunofluorescence Assay* (IF Assay) dan *Western Blot*. Rangkaian konstruksi pada penelitian ini dapat dijadikan model penelitian subunit vaksin yang dapat diterapkan untuk penanganan penyakit pada manusia. Penelitian ini merupakan penelitian deskriptif kualitatif yang didesain sebagai *true experimental* dengan *post-test only control group* yang terdiri atas sampel positif sebagai subjek penelitian dan dibandingkan dengan sampel negatif. Konstruksi genetik dilakukan dengan amplifikasi menggunakan PCR dan disisipkan ke dalam plasmid pVAX1. Ekspresi protein PCV3 diuji pada sel HEK293A (*Human Embryonic Kidney*) dengan pengujian *Immunofluorescence Assay* dan sel *Escherichia coli* BL21 dengan pengujian *Western Blot*. Hasil penelitian menunjukkan konstruksi genetik pada PCV3 berhasil dilakukan dengan hasil amplifikasi panjang fragmen berukuran 0,9 Kb. Sedangkan hasil IF Assay menunjukkan bahwa protein kapsid terekspresi pada sel HEK293A yang ditunjukkan dengan sinyal fluoresensi berwarna merah. Selain itu, protein kapsid juga terekspresi pada sel *Escherichia coli* BL21 yang terdeteksi pada pengujian *Western Blot* memiliki ukuran berat molekul 27 kDa. Oleh karena itu, hasil penelitian ini dapat dijadikan dasar pemahaman mengenai efektifitas subunit vaksin melalui hasil ekspresi protein. Protein yang didapatkan dari rangkaian penelitian ini dapat dijadikan kandidat untuk penelitian selanjutnya yaitu pengujian produksi subunit vaksin dan pengujiannya terhadap hewan coba.

Kata kunci: Ekspresi gen rekombinan, *Porcine Circovirus 3*, Subunit Vaksin.

CONSTRUCTION AND EXPRESSION OF THE *Porcine Circovirus 3* (PCV3) CAPSID PROTEIN AS A CANDIDATE FOR IN VITRO SUBUNIT VACCINE PRODUCTION

Muhammad Azka Shafara Zain, Kholifah Holil, Didik Wahyudi

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

ABSTRACT

Pigs are a farm commodity with economic value and high market demand in several pig-producing countries. However, pigs are susceptible to diseases that cause losses, one of which is the Porcine circovirus 3 (PCV3) virus infection. PCV3 specifically infects the respiratory tract and internal organs, which can cause complications in pigs. This study aims to construct the ORF2 gene (the gene that encodes the capsid protein) and test its expression using the Immunofluorescence Assay (IF Assay) and Western Blot methods. The construction series in this study can be used as a model for subunit vaccine research that can be applied to treat diseases in humans. This study is a qualitative descriptive study designed as a true experiment with a post-test only control group consisting of positive samples as research subjects and compared with negative samples. Genetic construction was carried out by amplification using PCR and inserted into the pVAX1 plasmid. PCV3 protein expression was tested in HEK293A (Human Embryonic Kidney) cells using the Immunofluorescence Assay and *Escherichia coli* BL21 cells using the Western Blot test. The results of the study showed that the genetic construction of PCV3 was successful with a 0.9 kb fragment amplification. Meanwhile, the IF Assay results showed that the capsid protein was expressed in HEK293A cells, indicated by a red fluorescence signal. Furthermore, the capsid protein was also expressed in *Escherichia coli* BL21 cells, detected in Western Blot testing with a molecular weight of 27 kDa. Therefore, the results of this study can be used as a basis for understanding the effectiveness of vaccine subunits through protein expression results. The proteins obtained from this series of studies can be used as candidates for further research, namely testing the production of vaccine subunits and testing them on experimental animals.

Keywords: Recombinant gene expression, Porcine Circovirus 3, Subunit Vaccine.

تكوين وتعبير بروتين قفيصة فيروس الدوران الخنازيري 3 (PCV3) كمرشح لإنتاج لقاح من الوحدات الفرعية في المختبر

محمد أزكى صفر زين، خليفة خليل، ديديك وحيودي

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

ملخص

تُعدّ الخنازير سلعة حيوانية ذات قيمة اقتصادية وطلب سوقي مرتفع في العديد من الدول المنتجة لها. مع ذلك، تُعدّ الخنازير عرضةً للأمراض التي تُسبب خسائر، ومنها عدوى فيروس الخنازير الدائري 3 (PCV3). يُصيب فيروس PCV3 الجهاز التنفسي والأعضاء الداخلية تحديدًا، مما قد يُسبب مضاعفات خطيرة للخنازير. تهدف هذه الدراسة إلى بناء جين ORF2 (الجين المسؤول عن ترميز بروتين الغلاف) واختبار تعبيره باستخدام تقنيتي فحص التآلق المناعي (IF Assay) والتلطّخ الغربي (Western Blot). يُمكن استخدام سلسلة البناء الجيني في هذه الدراسة كنموذج لأبحاث لقاحات الوحدات الفرعية التي يُمكن تطبيقها لعلاج الأمراض لدى البشر. هذه الدراسة وصفية نوعية، مصممة كتجربة حقيقية مع مجموعة تحكم بعد الاختبار فقط، تتكون من عينات إيجابية كعينة بحثية، ومقارنتها بعينات سلبية. تم البناء الجيني عن طريق التضخيم باستخدام تفاعل البوليميراز المتسلسل (PCR) وإدخاله في بلازميد pVAX1. تم اختبار التعبير البروتيني لفيروس PCV3 في خلايا HEK293A (خلايا الكلى الجنينية البشرية) باستخدام فحص التآلق المناعي، وفي خلايا الإشريكية القولونية BL21 باستخدام اختبار ويسترن بلوت. أظهرت نتائج الدراسة نجاح البناء الجيني لفيروس PCV3 بتضخيم قطعة بطول 0.9 كيلوبابت. في الوقت نفسه، أظهرت نتائج فحص التآلق المناعي التعبير عن بروتين الغلاف في خلايا HEK293A، كما يتضح من إشارة التآلق الأحمر. علاوة على ذلك، تم التعبير عن بروتين الغلاف أيضًا في خلايا الإشريكية القولونية BL21، حيث تم الكشف عنه في اختبار ويسترن بلوت بوزن جزيئي قدره 27 كيلو دالتون. لذلك، يمكن استخدام نتائج هذه الدراسة كأساس لفهم فعالية وحدات اللقاح الفرعية من خلال نتائج التعبير البروتيني. يمكن استخدام البروتينات التي تم الحصول عليها من هذه السلسلة من الدراسات كمرشحات لمزيد من الأبحاث، وتحديدًا لاختبار إنتاج وحدات اللقاح الفرعية واختبارها على الحيوانات المخبرية.

الكلمات الرئيسية: التعبير الجيني المؤتلف، فيروس الخنازير الدائري 3، لقاح الوحدة الفرعية

KATA PENGANTAR

Puji Syukur kehadiran Allah SWT yang telah menganugerahkan Rahmat dan karunia-Nya sehingga penulis dapat Proposal penelitian skripsi, penulis menyampaikan rasa terimakasih kepada:

1. Prof. Dr. Hj. Ilfi Nur Diana, M.Si., CAHRM., CRMP., selaku Rektor Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang
2. Dr. H. Agus Mulyono, M.Kes, M.Si selaku Dekan Fakultas Sains dan Teknologi UIN Maulana Malik Ibrahim Malang
3. Prof. Dr. Hj. Retno Susilowati, M.Si selaku Ketua Program Studi Biologi UIN Maulana Malik Ibrahim Malang
4. Ibu Kholifah Holil, M.Si dan Bapak Didik Wahyudi, M.Si selaku dosen pembimbing yang telah membimbing dengan penuh kesabaran dan meluangkan waktu untuk membimbing penulis sehingga proposal skripsi ini dapat diselesaikan.
5. Ibu Dr. Kiptiyah, M.Si dan Ibu Maharani Retna Duhita, M.Sc., Ph.D.Med.Sc. selaku dosen penguji yang telah banyak memberikan advis serta saran sehingga naskah skripsi ini menjadi lebih baik.
6. Bapak Dr. Muhammad Saefi, M.Pd. selaku dosen wali yang telah memberikan semangat dan motivasi sehingga penulis dapat menyelesaikan studi dengan baik.
7. Asst. Dr. Yaowaluck Maprang Roshorm dan Assoc. Prof. Dr. Kanokwan Poomputsa selaku kepala laboratorium *Animal Cell Culture* yang telah banyak memberikan saran dan arahan selama proses pembelajaran di dalam laboratorium.
8. Dr. Kanokporn Polyiam, Virakorn Ploypanichcharoen, dan Dr. Namphueng Butkhot selaku mentor dan pemandu pembelajaran di dalam laboratorium *Animal Cell Culture* yang selalu sabar dan perhatian dalam memberikan pemahaman mengenai keterampilan di laboratorium.
9. Seluruh staff Laboratorium *Animal Cell Culture* di SBT KMUTT

Semoga kebaikan yang telah diberikan kepada penulis mendapatkan balasan dari Allah Swt. Skripsi ini ditulis dengan sebaik-baiknya, namun apabila ditemukan adanya kekurangan, saran dan kritik yang membangun sangat diharapkan.

Wassalamu'alaikum Wr. Wb.

DAFTAR ISI

HALAMAN COVER	I
HALAMAN JUDUL	II
LEMBAR 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
DAFTAR SINGKATAN.....	XVIII
 BAB I PENDAHULUAN	 1
1.1. Latar Belakang	1
1.2. Rumusan Masalah.....	6
1.3. Tujuan	6
1.4. Manfaat Penelitian	7
1.5. Batasan Masalah	7
 BAB II TINJAUAN PUSTAKA	 9
2.1 <i>Porcine Circovirus 3</i>	9
2.1.1 Definisi dan struktur virus PCV3	9
2.1.2 Epidemiologi dan dampak klinis.....	12
2.1.3 Siklus hidup dan patogenesis	14
2.2 Protein Kapsid PCV3	16
2.3 Vaksin Subunit PCV3	18
2.4 Sistem Ekspresi	22
2.4.1 Sel <i>Human Embryonic Kidney 293A</i>	22
2.4.2 Sel <i>Eschericia coli</i> BL21	23
2.5 Metode Uji Imunogenisitas.....	25
 BAB III METODE PENELITIAN	 32
3.1 Rancangan Penelitian.....	32
3.2 Variabel Penelitian	32
3.3 Waktu dan Tempat.....	33
3.4 Alat dan Bahan.....	33
3.4.1 Alat.....	33
3.4.2 Bahan.....	34
3.5 Prosedur Penelitian	35
3.5.1 Preparasi Ruang, Alat, dan Bahan.....	35
3.5.2 Konstruksi fragmen gen	36
3.5.3 Transfeksi ke Sel HEK293A	40
3.5.4 Transformasi ke <i>E.coli</i> BL21	41

3.5.5 Ekspresi Protein	42
3.5.6 Analisis Data	45
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN	47
4.1 Konstruksi Genetik Protein Kapsid Virus PCV3	47
4.2 Ekspresi Protein Kapsid dari <i>Porcine Circovirus 3</i> (PCV3) pada sel <i>Human Embryonic Kidney 293A</i> (HEK293A)	50
4.3 Ekspresi Protein Kapsid dari <i>Porcine Circovirus 3</i> (PCV3) pada <i>Escherichia coli</i> BL21	56
BAB V PENUTUP	60
5.1 Kesimpulan	60
5.2 Saran	60
DAFTAR PUSTAKA.....	61
LAMPIRAN-LAMPIRAN	69

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1.1. Struktur virus PCV3	Error! Bookmark not defined.
Gambar 2.4.1. Kultur Sel HEK239A)	22
Gambar 2.4.2. Sel Bakteri <i>Eschericia Coli</i> BL21	24
Gambar 2.5.1. Prinsip metode Immunofluorescence.....	26
Gambar 2.5.2. Contoh Hasil dari Pengujian <i>Immunofluorescence</i>	27
Gambar 2.5.3. Ilustrasi pengikatan protein dengan antibodi dan enzim	30
Gambar 4.1.1 Hasil Konstruksi Genetik.....	47

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. Dokumentasi Penelitian	69
Lampiran 2. Hasil <i>Sreening Rapid Size Assay</i>	71
Lampiran 3. Hasil Pengecekan Konsentrasi plasmid/DNA sampel positif	71
Lampiran 4. Hasil Immunofluoerescence Staining Assay.....	71

DAFTAR SINGKATAN

Simbol/Singkatan	Keterangan
<i>RNA</i>	<i>Ribonucleic Acid</i>
<i>DNA</i>	<i>Deoxyribonucleic Acid</i>
<i>ssDNA</i>	<i>single stranded DNA</i>
<i>dsDNA</i>	<i>double stranded DNA</i>
g	gram
CO ₂	Karbondioksida
L	Liter
μL	Mikroliter
°C	Derajat celcius
Rpm	Rotation per minute
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
bp	<i>base pair</i>
kDa	<i>Kilodalton</i>
pH	<i>Potential of Hydrogen</i> (derajat keasaman)
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
LB	Luria-Broth
MHC	<i>Major Histocompatibility Complex</i>
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
NaHCO ₃	Natrium bikarbonat
TAE	Tris-base, Asetic Acid, dan 0.5 M EDTA pH 8.0
SDS-PAGE	<i>Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis</i>

Penyingkatan dan penggunaan satuan mengikuti standar internasional (SI)

BAB I

PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Porcine Circovirus 3 (PCV3) adalah virus yang termasuk dalam Famili Circoviridae yang menyerang populasi babi di seluruh dunia (Li & He, 2022). Virus ini pertama kali diidentifikasi pada babi yang menderita sindrom dermatitis dan nefropati (*Porcine Dermatitis and Nephropathy Syndrome*) di Amerika Serikat pada tahun 2015 (Palinski *et al.*, 2017). Sejak saat itu, penyakit ini banyak diteliti di negara-negara peternak babi seperti China (Ku *et al.*, 2017), Polandia (Stadejek *et al.*, 2017), Rusia (Yuzhakov *et al.*, 2018), Jepang (Hayashi *et al.*, 2018), Korea (Cho *et al.*, 2020), dan Thailand (Polyiam *et al.*, 2021).

Virus PCV3 dalam industri peternakan babi merupakan masalah nyata yang cukup merugikan bagi beberapa negara peternak babi (Kroeger *et al.*, 2022). Virus ini merupakan penyebab terjadinya penyakit PCVAD (*PCV-associated disease*) dengan gejala klinis seperti inflamasi multisistemik, tremor kongenital, gangguan pernapasan, diare, aborsi pada babi betina, dan peradangan jantung pada anak babi (Kwon *et al.*, 2017). Selain itu, virus ini dapat menyerang babi melalui saluran pernapasan serta dapat ditularkan dari induk babi ke anak babi selama kehamilan maupun pasca kehamilan melalui plasenta dan kolostrum (Silva *et al.*, 2023).

Riset sebelumnya yang terkait dengan infeksi PCV3 menyatakan bahwa antigen PCV3 juga terdeteksi di beberapa sel imun seperti makrofag, limfosit, neutrofil, eosinofil, dan sel epitel (di seluruh bagian tubuh yang terinfeksi) (Palinski *et al.*, 2017). Respon imun bawaan telah terbukti dalam memerangi infeksi virus PCV3 dengan adanya peningkatan regulasi protein yang dikode oleh gen ISG (*Interferon-Stimulated Genes*). Ekspresi MHC-I dan MHC-II juga meningkat

secara signifikan oleh infeksi PCV3, hal ini dapat memodulasi respon imun adaptif pada tubuh inang dengan memfasilitasi aktivitas sel-sel penyaji antigen (*Antigen Presenting Cell*) dan sel T sitotoksik (Jiang *et al.*, 2020).

Reaksi antibodi inang terhadap antigen PCV3 tak lepas dari struktur virus PCV3 yang mampu memodulasi sistem imunitas dalam tubuh inang. PCV3 memiliki struktur morfologi ikosahedral dengan diameter sekitar 17 nm dan tidak memiliki selubung (*non-envelope*). Genom Virus PCV3 terdiri dari DNA untai tunggal berbentuk lingkaran (*Circular single-stranded*) (Tochetto *et al.*, 2017). Genom PCV3 terdiri dari 2000 nukleotida dan memiliki tiga *Open Reading Frame* (ORF) utama. ORF1 pada PCV3 mengkode protein replikasi (rep gene), ORF2 mengkode protein kapsid (Cap), dan ORF3 belum diketahui secara pasti fungsinya (Phan *et al.*, 2016). Secara fungsional, ORF2 memiliki peran penting pada virus PCV3 karena mengkode asam amino yang terkonservasi (*conserved*) yaitu A24V and R27K, yang kemudian menghasilkan protein kapsid yang dapat berinteraksi dengan sistem imunitas tubuh inang (Yao *et al.*, 2021).

Protein kapsid merupakan protein struktural dan fungsional yang dinilai sebagai partikel antigen dari virus PCV3. Protein kapsid memiliki epitop untuk sel B yaitu pada asam amino urutan 93-103, 109-146, 170-181 dan 192-202, serta epitop untuk sel T yaitu pada urutan asam amino 101-109, 113-121, 172-180 dan 201-210 (Zou *et al.*, 2018). Bagian-bagian inilah yang bersifat imunogenik dan akan direspon oleh sel imun adaptif seperti sel T dan sel B. Seperti virus pada umumnya, sel inang memproses virus PCV3 dengan mengaktifkan pensinyalan interferon terlebih dahulu. Namun, PCV3 juga mempunyai mekanisme penghambatan terhadap pensinyalan tersebut yaitu dengan adanya interaksi

penghambatan pada kompleks ISGF3 (*Interferon-Stimulated Gene Factor 3*) lebih tepatnya pada STAT2 (*Signal Transducer and Activator of Transcription 2*) oleh protein kapsid. Hal ini mengakibatkan promotor ISRE (*Interferon-Stimulated Response Element*) terhambat dan produksi Interferon-I juga terganggu (Liu *et al.*, 2021). Protein kapsid juga dapat berikatan dengan protein G3BP1 (*GTPase-activating protein-binding protein 1*) yang akan mencegah cGAS (*Cyclic GMP-AMP Synthase*) untuk mengenali DNA dari virus PCV3 ini (Chen *et al.*, 2023). Oleh karena itu, protein kapsid merupakan partikel yang penting dalam proses infeksi virus PCV3 dan dapat dijadikan sebagai kandidat partikel untuk produksi vaksin subunit guna penanganan penyakit yang disebabkan oleh virus PCV3.

Penanganan penyakit infeksi virus yang paling efektif adalah dengan melakukan vaksinasi. Vaksinasi merupakan prosedur untuk meningkatkan derajat imunitas protektif terhadap patogen atau toksin tertentu dengan preparat non-virulen/non toksik melalui induksi respon imun dengan stimulasi antibodi, imunitas seluler, maupun keduanya (Kliegman *et al.*, 2007; Baratawidjaja, *et al.*, 2010). Salah satu tanda keberhasilan vaksinasi adalah meningkatnya efektor sistem imun sebagai respon vaksinasi. Efektor imun utama yang dicetuskan sebagai bentuk respon terhadap vaksin adalah pembentukan antibodi (Tüting *et al.*, 2003).

Virus PCV3 merupakan virus yang tergolong baru ditemukan dan belum ada vaksin komersial yang secara resmi diedarkan (Cao *et al.*, 2023). Vaksin untuk PCV pada umumnya diproduksi dari virus yang diinaktifkan dan vaksin berbasis protein rekombinan, misalnya protein kapsid. Pada generasi sebelumnya, virus PCV2 telah ditemukan vaksin-vaksin komersial yang telah digunakan seperti CIRCOVAC-*inactivated viruses* (PT. Romindo Primavetcom), Circulent PCV-M G2 (Ceva

Swine), dan Cirbloc® M Hyo (Merck Animal Health USA). Vaksin-vaksin tersebut sebagian besar berbahan dasar *whole cell* dan dapat menimbulkan efek samping pada inangnya. Hal tersebut dapat terjadi karena individu tidak dapat mengontrol patogen meskipun dilemahkan atau diinaktifkan, sehingga patogen dapat berubah menjadi agen yang infeksius dan menimbulkan manifestasi klinis dalam tubuh inang. Maka dari itu, diperlukan pengembangan vaksin yang tidak berbahan *whole cell* sehingga memiliki efek samping yang dapat diminimalisasi dan efektif untuk mencegah penyakit.

Pengembangan vaksin untuk virus PCV3 saat ini fokus pada vaksin yang dihasilkan dari sebagian partikel antigenik dari virus tersebut yaitu dalam bentuk VLP (*Virus-Like Particle*), Vaksin Subunit, maupun Vaksin mRNA. Penelitian yang dilakukan oleh Wu *et al.*, (2024) membuktikan bahwa vaksin berbentuk VLP yang disusun atas protein kapsid PCV2-PCV3 dapat menginduksi sistem imun pada tikus dengan parameter yang digunakan yaitu tingkat ekspresi sitokin dan proliferasi sel limfosit. Penelitian serupa juga dilakukan oleh Q. Wang *et al.*, (2024), dalam penelitiannya digunakan vaksin subunit PCV3 yang diproduksi dari protein kapsid dan diinjeksi kedalam tikus, hasilnya menunjukkan bahwa vaksin subunit PCV3 dapat menginduksi antibodi spesifik untuk protein kapsid PCV3. Dengan demikian maka vaksin untuk PCV3 dapat dikembangkan dalam bentuk vaksin subunit dengan protein kapsid sebagai kandidat bahan dasar yang digunakan.

Vaksin subunit merupakan vaksin yang diproduksi dari komponen atau fragmen spesifik virus bersifat imunogenik berupa protein untuk memicu respons imun tubuh (Cid & Bolívar, 2021). Pada kasus PCV3, vaksin subunit dapat diproduksi dalam beberapa tahap, yaitu tahap *in silico* (meliputi pemetaan epitop

dan *docking* secara molekuler), tahap *in vitro* (meliputi konstruksi genetik, uji ekspresi protein, dan aktivitas antigen terhadap antibodi), dan tahap *in vivo* (meliputi pengujian vaksinasi dan evaluasi klinis). Secara spesifik, penelitian ini dilakukan untuk mengetahui apakah genetik PCV3 yang mengkode protein antigenik (kapsid) dapat dikonstruksi dan dapat diekspresikan pada sel inang. Protein yang diekspresikan pada sel inang tersebut akan dimurnikan dan digunakan sebagai bahan utama dalam produksi vaksin subunit. Oleh karena itu, pada penelitian ini, dilakukan tahap kedua yaitu *in vitro* dengan fokus utama pada konstruksi genetik dan uji ekspresi protein. Pada tahap konstruksi genetik, dilibatkan gen PCV3 sebagai target utama, plasmid pVAX1 sebagai vektor kloning, His-Tag sebagai penanda asam amino, dan Tag V5 sebagai *epitope tag* untuk deteksi dengan antibodi komersial anti-V5. Sedangkan uji ekspresi protein dilakukan dengan 2 metode yaitu *Immunofluorescence Assay* (dengan inang sel *Human Embryonic Kidney* 293A) dan *Western Blot Assay* (dengan inang sel *Escherichia coli* BL21).

Pembelajaran mengenai virus merupakan salah satu upaya untuk melihat tanda kebesaran Tuhan dalam menciptakan makhluknya. Allah berfirman dalam surah Saba' ayat 22 sebagai berikut:

قُلِ ادْعُوا الَّذِينَ زَعَمْتُمْ مِنْ دُونِ اللَّهِ لَا يَمْلِكُونَ مِثْقَالَ ذَرَّةٍ فِي السَّمَوَاتِ وَلَا فِي الْأَرْضِ وَمَا لَهُمْ فِيهِمَا مِنْ شِرْكٍَ وَمَا لَهُ مِنْهُمْ مَنْ ظَاهِرٌ

Artinya: “Katakanlah (Nabi Muhammad), “Serulah mereka yang kamu anggap (sebagai tuhan) selain Allah! Mereka tidak memiliki (kekuasaan) seberat zarrah pun di langit dan di bumi. Mereka juga sama sekali tidak mempunyai peran serta dalam (penciptaan) langit dan bumi dan tidak ada di antara mereka yang menjadi pembantu bagi-Nya.” (Q.S. Saba' [34]: 22)

Menurut Imam At-Ṭabari dalam kitabnya Tafsir At-Ṭabari (923 M) yang di-*tahqiq* oleh Bakri dkk. (2007) menjelaskan bahwa maksud dari kata *zarrah* tersebut adalah sesuatu yang tidak gaib bagi Allah di langit maupun di bumi. Lebih lanjut Shihab (2002) menjelaskan bahwa arti dari kata *zarrah* adalah sesuatu yang sangat kecil, pada masa kini kata tersebut diartikan sebagai atom, sedangkan firman-Nya yang lebih kecil dari *zarrah* adalah proton dan neutron yang merupakan dua unsur dalam atom. Dalam kitab Tafsir Ilmi dari Lajnah Pentashihan Mushaf Al-Qur'an (2015) kata *zarrah* pada ayat ini berarti benda yang sangat kecil. Dari sudut pandang manusia, benda itu termasuk jasad renik atau molekul atom. Melalui ayat ini Allah mengajari manusia bahwa hanya Dialah yang mengatur kehidupan dalam dunia jasad renik yang sangat luas. Dunia jasad renik tersembunyi dari manusia dan mereka tidak memiliki kontrol apapun atasnya. Jasad renik memiliki ukuran sangat kecil, misalnya virus yang hanya berukuran antara 50-500 nanometer.

1.2. Rumusan Masalah

Rumusan masalah pada penelitian ini adalah:

1. Bagaimana hasil konstruksi fragmen genetik PCV3 yang mengkode protein kapsid?
2. Bagaimana ekspresi protein kapsid virus PCV3 pada sistem inang sel *Human Embryonic Kidney* 293A (HEK293A) yang dideteksi dengan menggunakan metode *Immunofluorescence Assay*?
3. Bagaimana ekspresi protein kapsid virus PCV3 pada sistem inang *Escherichia coli* BL21 yang dideteksi dengan menggunakan metode *Western Blot*?

1.3. Tujuan

Tujuan dari penelitian ini adalah:

1. Mengevaluasi hasil konstruksi genetik PCV3 yang mengkode protein kapsid.
2. Mengevaluasi hasil ekspresi protein kapsid virus PCV3 pada sistem inang sel *Human Embryonic Kidney 293A* (HEK293A) yang dideteksi dengan menggunakan metode *Immunofluorescence Assay*
3. Mengevaluasi hasil ekspresi protein kapsid virus PCV3 pada sistem inang *Escherichia coli* BL21 yang dideteksi dengan menggunakan metode *Western Blot*

1.4. Manfaat Penelitian

Manfaat pada penelitian ini adalah:

1. Manfaat Teoritis: dapat menambah informasi dan wawasan mengenai ekspresi protein kapsid dari virus PCV3 menggunakan metode *Imunofluoresence Staining Assay* dan Western Blot Secara In Vitro.
2. Manfaat Aplikatif: Dapat dijadikan dasar untuk pertimbangan klinis pengaplikasian subunit vaksin untuk penanganan penyakit yang disebabkan virus secara preventif.

1.5. Batasan Masalah

Batasan masalah pada penelitian ini adalah:

1. Penelitian ini menggunakan sel HEK293A dan *E.coli* BL21 sebagai sistem inang ekspresi, didapatkan dari sediaan laboratorium *Animal Cell Culture* King Mongkuts University of Technology Thonburi.
2. Pengamatan pada penelitian ini dibatasi pada ekspresi protein kapsid PCV3 yang diujikan secara in vitro ke dalam dua sistem inang eukariotik yaitu HEK293A dan prokariotik *E.coli* BL21. Ekspresi proteinnya dilihat dari pancaran fluoresence (IF Assay) dan berat molekul DNA (Western Blot).

3. Penelitian ini terbatas pada proses in vitro saja, yang meliputi konstruksi genetik dan ekspresi protein.

BAB II TINJAUAN PUSTAKA

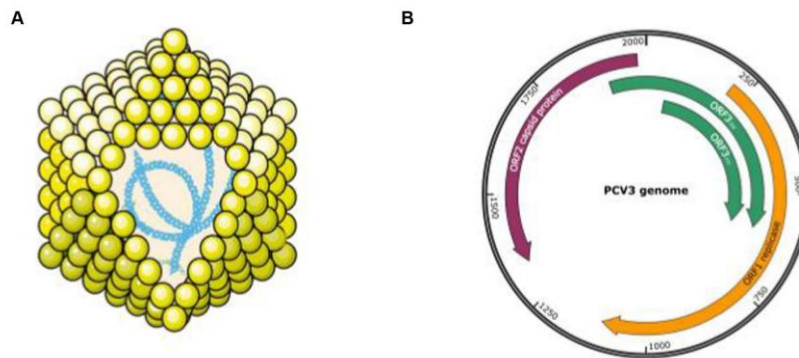
2.1 *Porcine Circovirus 3*

2.1.1 Definisi dan struktur virus PCV3

Porcine Circovirus 3 (PCV3) merupakan virus yang menyebabkan infeksi pada babi dengan berbagai gejala seperti kegagalan reproduksi, peradangan multisistemik, tremor kongenital, gangguan pernapasan, diare, serta sindrom dermatitis dan nefropati pada babi. Virus ini pertama kali dilaporkan pada tahun 2015 di Amerika Serikat melalui analisis metagenomik pada babi dengan gejala sindrom dermatitis dan nefropati (Porcine Dermatitis and Nephropathy Syndrome) (Kroeger et al., 2022). Seperti virus yang tergolong dalam famili circoviridae pada umumnya, virus ini memiliki struktur virion dengan diameter 17 nm, berbentuk ikosahedral, dan tidak memiliki selubung (non-envelope) (Todd et al., 1991; Meehan et al., 1998; Crowther et al., 2003; Rosario et al., 2017). Genom PCV3 terdiri dari satu molekul asam nukleat tunggal yang dikemas dalam satu kapsid virus (monopartite). Kemudian genomnya juga berbentuk melingkar dan memiliki ukuran sekitar 2000 bp (nt) (Fux et al., 2018; Ha et al., 2018).

Menurut (M. Zhang et al., 2022) taksonomi dari *Porcine Circovirus 3* (PCV3) adalah sebagai berikut:

Realm	: <i>Monodnaviria</i>
Phylum	: <i>Cressnaviricota</i>
Ordo	: <i>Cirivirales</i>
Famili	: <i>Circoviridae</i>
Genus	: <i>Circovirus</i>
Spesies	: <i>Porcine circovirus 3</i> (PCV3)



Gambar 2.1.1. Struktur virus PCV3. Keterangan: (A) PCV3 memiliki genom DNA untai tunggal berbentuk lingkaran, dan kapsidnya terdiri dari 12 pentamer dengan lima sisi. (B) Genom PCV3 berukuran sekitar 2000-nt dan mengandung *Open Reading Frame* (ORF) utama yaitu ORF1, ORF2, dan ORF3 (Chen *et al.*, 2023)

Virus ini hanya dapat dilihat dengan alat bantu seperti kaca pembesar atau mikroskop. Allah berfirman dalam surah An-Nur ayat 45 yang berbunyi:

وَاللَّهُ خَلَقَ كُلَّ دَابَّةٍ مِّن مَّاءٍ فَمِنْهُمْ مَّن يَمْشِي عَلَىٰ بَطْنِهِ وَمِنْهُمْ مَّن يَمْشِي عَلَىٰ رِجْلَيْنِ وَمِنْهُمْ مَّن يَمْشِي عَلَىٰ أَرْبَعٍ يَخْلُقُ اللَّهُ مَا يَشَاءُ إِنَّ اللَّهَ عَلَىٰ كُلِّ شَيْءٍ قَدِيرٌ

Artinya: “Allah menciptakan semua jenis hewan dari air. Sebagian berjalan dengan perutnya, sebagian berjalan dengan dua kaki, dan sebagian (yang lain) berjalan dengan empat kaki. Allah menciptakan apa yang Dia kehendaki. Sesungguhnya Allah Maha Kuasa atas segala sesuatu” (QS. An-Nur [24]: 45)

Lajnah Pentashihan Mushaf Al-Qur’an (2016) dalam tafsir ringkasnya menjelaskan bahwa kata *dabbah* dapat diartikan sebagai seekor binatang yang merayap atau bergerak dengan kakinya dari satu tempat ke tempat lainnya yang ada di bumi, baik di darat maupun di laut, dan juga burung-burung yang terbang dengan kedua sayapnya, termasuk manusia. Dalam Kitab Tafsir Ilmi dari Lajnah Pentashihan Mushaf Al-Qur’an (2015) kata *dabbah* mengandung arti yang lebih dalam yaitu semua makhluk hidup ciptaan Allah yang sudah maupun belum dikenal manusia termasuk makhluk yang baru bisa tampak bila dilihat dengan bantuan kaca pembesar. Dalam hal ini, virus merupakan salah satu makhluk hidup yang termasuk

dalam golongan *dabbah* tersebut. Hal ini diperkuat dengan pendapat Syaikh Zaghoul Al-Naggar (2007) dalam Kitab *Tafsirul Ayatil Kauniyat Fil Qur'anil Karim* yang menyatakan bahwa virus merupakan bagian dari *dabbah* yang dimaksud dalam Al-Qur'an.

Struktur genom virus PCV3 terdiri dari tiga *Open Reading Frame* (ORF) utama yang tersusun pada untai replikatif (Rosario *et al.*, 2017) (Gambar 2.1.1). ORF1 terletak pada untai positif dan diidentifikasi sebagai wilayah yang paling konservatif dalam genom circovirus, mengkode protein Rep dan Rep' yang terlibat dalam inisiasi replikasi virus (Rosario *et al.*, 2012). ORF2 terletak pada untai negatif DNA virus dan memiliki panjang 645 bp (241 aa). ORF2 mengkode protein struktural tunggal (Kapsid) yang bersifat imunogenik (Nawagitgul *et al.*, 2002). ORF3 berorientasi pada untai negatif, yang mengkode protein non-struktural dan mengatur apoptosis sel inang pada PCV1 dan PCV2 (Karuppannan & Kwang, 2011; Lin *et al.*, 2011). Sementara fungsi dari ORF3 masih belum jelas diketahui pada PCV3 (Kim *et al.*, 2018). Berdasarkan variasi asam amino, PCV3 dibagi menjadi tiga klade utama yaitu PCV3a, PCV3b, dan PCV3c (Qi *et al.*, 2019). PCV3a dapat diklasifikasikan lebih lanjut menjadi subklade, termasuk PCV3a-1, PCV3a-2, dan satu klade intermediet (PCV3a-IM) (Fu *et al.*, 2017).

Open Reading Frame (ORF) pada virus PCV3 merupakan bagian struktur yang berkaitan langsung dengan siklus hidup virus. ORF1 berperan dalam replikasi virus sedangkan ORF2 berperan dalam mekanisme patogenesis melalui protein kapsid yang dikodenya (Chung *et al.*, 2021). Protein kapsid ini dalam beberapa penelitian dimanfaatkan sebagai subunit virus yang dimanfaatkan sebagai bahan vaksin (Subunit Vaksin). Pemanfaatan ini dikarenakan protein kapsid merupakan

protein antigenik yang dapat dideteksi antibodi dalam tubuh inang (Apostolopoulos & Chavda, 2024).

2.1.2 Epidemiologi dan dampak klinis

Hingga kini, PCV3 telah ditemukan menyebar luas pada populasi babi domestik maupun babi hutan di berbagai negara, baik pada hewan sakit maupun sehat, sehingga menimbulkan perhatian besar terkait potensi patogenisitas dan dampaknya terhadap industri peternakan (Pranoto et al., 2023). Epidemiologi infeksi Porcine Circovirus 3 (PCV3) menunjukkan karakteristik yang kompleks dengan cakupan inang yang relatif luas, meskipun manifestasi klinis utamanya tetap terbatas pada babi domestik. Secara umum, virus dari famili Circoviridae telah dilaporkan menginfeksi berbagai kelompok organisme, termasuk mamalia, burung, ikan, dan serangga (Opriessnig *et al.*, 2019). Khusus untuk PCV3, keberadaan materi genetik virus telah terdeteksi tidak hanya pada babi, tetapi juga pada spesies lain seperti anjing, sapi, tikus, keledai, hingga vektor potensial seperti nyamuk dan caplak (*Ixodes ricinus*). Bahkan, beberapa laporan menunjukkan deteksi PCV3 pada satwa liar seperti rusa dan chamois. Namun demikian, peran spesies non-swine dalam siklus epidemiologi PCV3 masih belum sepenuhnya jelas, dan sebagian besar studi menyimpulkan bahwa hewan liar hanya berkontribusi minimal terhadap transmisi virus ini. Dengan demikian, babi domestik tetap menjadi reservoir utama sekaligus inang yang paling relevan secara klinis dalam epidemiologi PCV3.

PCV3 telah dilaporkan tersebar luas di berbagai wilayah dunia, terutama di negara-negara dengan industri peternakan babi. Virus ini telah teridentifikasi di Amerika Utara, Amerika Selatan, Eropa, Afrika, dan Asia. Penyebaran yang luas ini mencerminkan kemampuan virus untuk bertahan dan beradaptasi pada berbagai

kondisi lingkungan serta sistem produksi peternakan yang berbeda. Selain itu, mobilitas perdagangan hewan dan produk peternakan turut berkontribusi terhadap penyebaran virus antar wilayah.

Infeksi PCV3 umumnya memiliki tingkat prevalensi yang tinggi namun dengan manifestasi klinis yang bervariasi. Studi seroepidemiologi menunjukkan bahwa tingkat seroprevalensi PCV3 dapat mencapai hingga 100% pada populasi babi di beberapa wilayah (Ouyang *et al.* 2019) yang mengindikasikan bahwa paparan virus ini sangat luas. Infeksi PCV3 dapat terjadi pada semua kelompok umur, mulai dari fetus hingga babi dewasa, dengan prevalensi tertinggi sering dilaporkan pada fase akhir kebuntingan serta pada anak babi dan fase sapih. Selain itu, induk primipara dilaporkan memiliki tingkat ekskresi virus yang lebih tinggi melalui kolostrum serta risiko infeksi janin yang lebih besar dibandingkan induk multipara. Meskipun demikian, banyak kasus infeksi PCV3 yang bersifat subklinis, sehingga keberadaannya sering tidak terdeteksi tanpa pemeriksaan molekuler.

Secara klinis, morbiditas yang disebabkan oleh kelompok penyakit terkait circovirus (*PCV-associated disease/PCVAD*) cenderung berkisar dari rendah hingga sedang, namun mortalitas dapat meningkat secara signifikan pada kondisi tertentu, terutama ketika terjadi komplikasi seperti *Porcine Dermatitis and Nephropathy Syndrome* (PDNS). Selain itu, infeksi PCV3 sering kali ditemukan bersamaan dengan patogen lain, seperti PCV2, yang dapat memperparah kondisi klinis melalui mekanisme ko-infeksi. Faktor lain seperti umur, status imun, serta latar belakang genetik ternak juga berperan dalam menentukan tingkat keparahan penyakit dan respons terhadap infeksi. Dengan demikian, meskipun PCV3 tidak selalu menimbulkan gejala yang berat secara langsung, keberadaannya tetap

menjadi faktor risiko penting dalam kesehatan dan produktivitas ternak babi secara keseluruhan.

2.1.3 Siklus hidup dan patogenesis

Siklus hidup Porcine Circovirus 3 (PCV3) diawali dengan tahap perlekatan (attachment) virus pada permukaan sel inang melalui interaksi antara protein kapsid (Cap) dengan molekul reseptor pada membran sel. Meskipun reseptor spesifik PCV3 belum sepenuhnya terkarakterisasi, virus dari famili Circoviridae umumnya memanfaatkan molekul permukaan seperti glikosaminoglikan untuk memfasilitasi proses awal infeksi. Setelah terjadi perlekatan, partikel virus akan memasuki sel melalui mekanisme endositosis, terutama yang dimediasi oleh clathrin, yang kemudian melibatkan protein dinamin dalam proses pembentukan vesikel endositik.

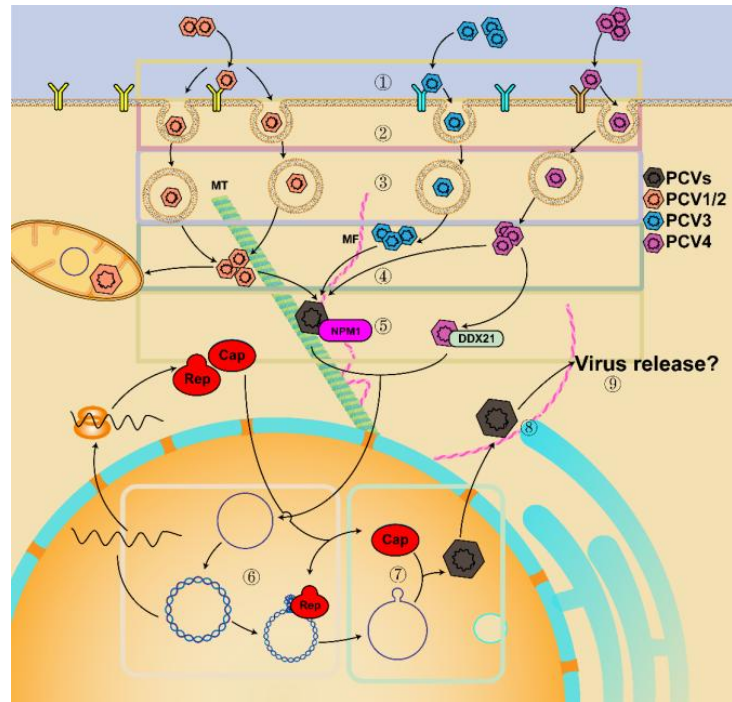
Setelah internalisasi, partikel virus mengalami proses uncoating di dalam endosom, yang diikuti dengan pelepasan genom DNA untai tunggal (ssDNA) ke sitoplasma dan selanjutnya ditranspor menuju nukleus sel inang. Transportasi ini sering kali melibatkan interaksi dengan sistem sitoskeleton sel, khususnya mikrotubulus yang berfungsi sebagai jalur pergerakan vesikel menuju inti sel. Di dalam nukleus, genom ssDNA virus akan dikonversi menjadi bentuk DNA untai ganda (dsDNA) oleh enzim sel inang. Tahap ini penting karena hanya bentuk dsDNA yang dapat digunakan sebagai template untuk proses transkripsi dan replikasi lebih lanjut.

Proses replikasi genom PCV3 berlangsung melalui mekanisme rolling circle replication yang dimediasi oleh protein replikase (Rep) yang dikode oleh ORF1. Protein Rep berperan dalam inisiasi replikasi dengan mengenali origin of

replication pada genom virus, kemudian memotong dan memulai sintesis DNA baru menggunakan enzim seluler. Selama tahap ini, terjadi produksi genom virus dalam jumlah besar yang akan digunakan untuk pembentukan partikel virus baru. Selain itu, proses transkripsi juga menghasilkan mRNA yang akan diterjemahkan menjadi protein struktural (kapsid) dan non-struktural yang diperlukan untuk siklus hidup virus.

Tahap berikutnya adalah sintesis dan perakitan (assembly) partikel virus. Protein kapsid (Cap) yang telah disintesis di sitoplasma akan ditranspor ke dalam nukleus, di mana proses perakitan virion terjadi. Protein kapsid akan membungkus genom DNA virus membentuk struktur ikosahedral yang khas. Proses ini berlangsung secara terkoordinasi antara protein virus dan faktor sel inang, sehingga menghasilkan partikel virus yang matang dan infeksius. Menariknya, protein kapsid tidak hanya berperan sebagai komponen struktural, tetapi juga memiliki fungsi dalam pengaturan interaksi virus dengan sistem imun inang.

Tahap akhir dari siklus hidup PCV3 adalah pelepasan (release) partikel virus baru dari sel inang. Mekanisme pelepasan ini belum sepenuhnya dipahami, namun diduga melibatkan proses lisis sel atau jalur eksositosis non-litik. Virus yang dilepaskan kemudian dapat menginfeksi sel lain, memperluas infeksi dalam jaringan inang. Secara keseluruhan, siklus hidup PCV3 menunjukkan ketergantungan yang tinggi terhadap mesin seluler inang, terutama dalam proses replikasi dan translasi, yang menjadi dasar penting dalam pengembangan strategi terapi maupun vaksin, khususnya berbasis protein kapsid sebagai target utama imunogenik.



Gambar 2.1.3. Siklus hidup virus PCV3 (Maity *et al.*, 2023)

2.2 Protein Kapsid PCV3

Protein kapsid *Porcine Circovirus 3* (PCV3) merupakan protein struktural utama yang dikode oleh *Open Reading Frame 2* (ORF2) pada genom virus. ORF2 berada dalam sistem genom *ambisense* khas famili *Circoviridae*, di mana arah transkripsi gen kapsid berlawanan dengan gen replikasi (ORF1), sehingga memungkinkan regulasi ekspresi gen yang efisien dalam ruang genom yang sangat terbatas. Protein kapsid PCV3 umumnya terdiri atas ± 214 hingga 216 asam amino dengan berat molekul berkisar 26-27 kDa.

Secara struktural, protein kapsid PCV3 menyusun partikel virus berbentuk ikosahedral tanpa selubung (*non-enveloped*) dengan simetri $T=1$, yang berarti kapsid tersusun atas 60 subunit protein identik. Setiap subunit protein Cap diperkirakan memiliki motif struktur konservatif berupa *jelly-roll fold* atau delapan untai β -barrel, yang merupakan ciri khas banyak virus kecil DNA. Struktur ini

memberikan stabilitas mekanik pada kapsid sekaligus fleksibilitas dalam berinteraksi dengan kondisi inang.

Interaksi antara protein kapsid PCV3 dengan sel inang pada tingkat fungsional memiliki beberapa domain penting yang menunjang siklus hidup virus. Salah satu domain utama adalah *Nuclear Localization Signal* (NLS) yang terletak pada terminal-N dan kaya akan residu basa seperti arginin dan lisin. Domain ini berperan dalam mengarahkan protein kapsid, bersama dengan genom virus, menuju nukleus sel inang melalui interaksi dengan sistem transport nukleus. Selain itu, protein kapsid juga memiliki kemampuan mengikat DNA (*DNA-binding domain*), yang memungkinkan interaksi langsung dengan genom ssDNA selama proses enkapsidasi. Beberapa residu asam amino spesifik juga berperan dalam menjaga stabilitas struktur kapsid dan mendukung proses perakitan virion secara efisien.

Protein kapsid bertindak sebagai mediator utama dalam proses pengenalan dan penempelan virus terhadap sel inang pada konteks interaksi antara inang dan patogen. Protein ini berinteraksi dengan molekul permukaan sel seperti glikosaminoglikan yang memfasilitasi masuknya virus melalui mekanisme endositosis. Selain itu, protein kapsid juga berperan dalam modulasi respon imun inang baik melalui pengenalan oleh reseptor imun bawaan maupun melalui interaksi dengan jalur pensinyalan seluler.

Protein kapsid PCV3 juga memiliki sifat antigenik yang tinggi, yang ditunjukkan oleh keberadaan epitop spesifik yang dapat dikenali oleh sel B dan sel T. Epitop-epitop ini umumnya terletak pada permukaan kapsid dan bersifat imunodominan, sehingga mampu memicu produksi antibodi spesifik serta aktivasi respon imun seluler. Beberapa studi menunjukkan bahwa wilayah tertentu pada

protein kapsid (termasuk daerah terminal-N dan loop permukaan) merupakan lokasi utama pengenalan oleh sistem imun. Hal inilah yang menjadi alasan protein kapsid dapat dijadikan sebagai kandidat utama dalam pengembangan vaksin subunit maupun sistem diagnostik berbasis imunologi.

2.3 Vaksin Subunit PCV3

Vaksin subunit merupakan salah satu bentuk vaksin generasi baru yang dikembangkan sebagai respons terhadap keterbatasan vaksin konvensional berbasis patogen utuh, baik yang dilemahkan (*live attenuated*) maupun diinaktivasi. Prinsip dasar vaksin subunit adalah penggunaan komponen antigenik spesifik dari patogen, seperti protein struktural atau fragmen epitop tertentu, yang mampu menginduksi respons imun protektif tanpa menghadirkan keseluruhan partikel infeksius. Pendekatan ini memberikan keunggulan dari segi keamanan karena tidak mengandung materi genetik virus yang dapat bereplikasi sehingga meminimalisasi resiko *reversion to virulence* serta menurunkan potensi efek samping. Dengan demikian, vaksin subunit menjadi alternatif strategis dalam pengembangan vaksin modern yang lebih aman dan terkontrol.

Pengembangan vaksin subunit untuk penanganan virus *Porcine Circovirus* 3 (PCV3) menggunakan protein kapsid (Cap) yang dikode oleh ORF2 yang dimanfaatkan sebagai antigen target utama dalam pengembangan vaksin subunit. Protein ini merupakan komponen struktural dominan yang membentuk permukaan virus dan secara langsung berinteraksi dengan sistem imun inang. Sifat imunogenisitasnya yang tinggi ditunjukkan oleh kemampuannya dalam memicu produksi antibodi spesifik serta respons imun seluler. Selain itu, protein Cap mengandung berbagai epitop protektif yang terletak pada permukaan kapsid, yang

dapat dikenali oleh sel B dan sel T. Epitop-epitop ini berperan penting dalam pembentukan antibodi penetral (*neutralizing antibodies*) yang mampu menghambat proses infeksi virus.

Produksi protein kapsid rekombinan sebagai bahan vaksin subunit memerlukan sistem ekspresi yang efisien dan mampu mempertahankan karakteristik antigenik protein. Sistem prokariotik seperti *Escherichia coli* sering digunakan karena keunggulannya dalam hal biaya produksi yang rendah, waktu ekspresi yang cepat, dan kemudahan manipulasi genetik. Namun demikian, sistem ini memiliki keterbatasan, terutama dalam hal pelipatan protein yang tepat (protein folding) dan ketiadaan modifikasi pasca-translasi, yang dapat menyebabkan terbentuknya *inclusion bodies*. Sebaliknya, sistem eukariotik seperti baculovirus pada sel serangga mampu menghasilkan protein dengan struktur yang lebih menyerupai kondisi alami virus, termasuk dalam aspek pelipatan dan stabilitas. Selain kedua sistem tersebut, platform alternatif seperti ragi (yeast expression system) dan tanaman (plant-based expression system) mulai dikembangkan sebagai solusi inovatif untuk produksi vaksin yang lebih ekonomis dan efektif.

Salah satu pendekatan lanjutan dalam pengembangan vaksin subunit adalah pemanfaatan teknologi *Virus-Like Particles* (VLPs). Protein kapsid PCV3 memiliki kemampuan intrinsik untuk melakukan self-assembly membentuk struktur partikel menyerupai virus asli, namun tanpa mengandung materi genetik. Struktur VLP ini mempertahankan morfologi dan organisasi antigenik virus, sehingga mampu meningkatkan efisiensi pengenalan oleh sistem imun. Keunggulan utama VLP terletak pada presentasi antigen yang bersifat repetitif dan partikulat, yang secara

signifikan meningkatkan aktivasi sel B dan produksi antibodi dibandingkan protein antigen dalam bentuk soliter.

Meskipun memiliki keunggulan dari segi keamanan, vaksin subunit umumnya memerlukan formulasi tambahan untuk meningkatkan efektivitas kinerjanya. Salah satu komponen penting dalam formulasi tersebut adalah adjuvan, yaitu zat seperti emulsi minyak dalam air atau aluminium hidroksida, yang berfungsi untuk meningkatkan respons imun baik secara humoral maupun seluler. Adjuvan bekerja dengan cara meningkatkan presentasi antigen oleh sel penyaji antigen (*Antigen Presenting Cell*) serta memperpanjang waktu paparan antigen dalam tubuh.

Evaluasi awal terhadap potensi imunogenisitas protein kapsid PCV3 umumnya tidak langsung dilakukan melalui uji *in vivo*, melainkan diawali dengan pendekatan *in vitro* untuk memastikan keberhasilan ekspresi dan pengenalan antigen oleh antibodi. Metode yang dapat dilakukan yaitu seperti *Immunofluorescence Assay* (IF Assay) dan *Western Blot*. IF Assay digunakan untuk mengamati ekspresi dan lokalisasi protein kapsid di dalam sel inang, serta memastikan bahwa protein yang diekspresikan mampu dikenali oleh antibodi spesifik melalui munculnya sinyal fluoresen. Sementara itu, *Western Blot* digunakan untuk mengonfirmasi keberadaan protein target berdasarkan ukuran molekuler dan spesifisitas interaksi antigen-antibodi. Hasil pengujian dari kedua metode ini dapat memberikan gambaran bahwa subunit vaksin memiliki sifat antigenik dan dapat dikenali oleh sistem imun sehingga layak untuk dilanjutkan ke tahap produksi dan pengujian imunogenisitas secara *in vivo*.

Pengembangan subunit vaksin secara umum merupakan suatu upaya manusia untuk menangani penyakit yang disebabkan oleh virus. Penanganan tersebut umumnya menggunakan virus serupa yang dilemahkan, diinaktifkan, atau diambil partikel antigeniknya saja. Hal ini selaras dengan firman Allah pada Qur'an Surah As-Syu'ara' ayat 80 yang berbunyi:

وَإِذَا مَرِضْتُ فَهُوَ يَشْفِينِ^٧

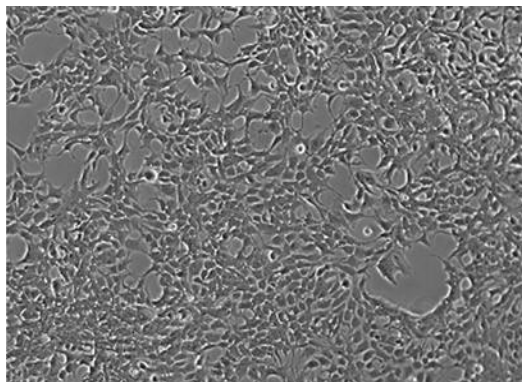
Artinya: “*Apabila aku sakit, Dialah yang menyembuhkanku*” (QS. As-Syu'ara' [26]:80)

Ayat diatas dalam beberapa tafsir dijelaskan dengan berbagai pendapat yang berbeda. At-Ṭabari dalam kitabnya Tafsir At-Ṭabari (923 M) yang di-*tahqiq* oleh Bakri dkk. (2007) menjelaskan bahwa ayat tersebut merupakan ungkapan Nabi Ibrahim yang penuh tawakal bahwa apabila dirinya sakit tidak ada yang mampu menyembuhkan kecuali Allah. Al-Qāsimī (2003) dalam tafsirnya *Mahasin At-ta'wiil* menguraikan bahwa ayat ini menggambarkan tata susila seorang hamba Allah kepada Khaliknya. Sebab penyakit itu kadang-kadang akibat dari perbuatan manusia sendiri, umpamanya disebabkan oleh pelanggaran terhadap norma-norma kesehatan, atau pola hidup sehari-hari, maka serangan penyakit terhadap tubuh tidak dapat dielakkan. Sebaliknya yang berhak menyembuhkan penyakit adalah Allah semata. Dalam kitab Tafsir Ilmi dari Lajnah Pentashihan Mushaf Al-Qur'an (2015) dijelaskan bahwa Allah telah menciptakan makhluk-makhluk renik yang dapat menimbulkan penyakit, namun Allah juga menciptakan obat dari jasad renik itu sendiri.

2.4 Sistem Ekspresi

2.4.1 Sel *Human Embryonic Kidney* 293A

Sel *Human Embryonic Kidney* 293A (HEK293A) merupakan salah satu turunan dari lini sel HEK293 yang berasal dari jaringan ginjal embrio manusia (Hu *et al.*, 2018). Sel HEK293 pertama kali dikembangkan pada tahun 1973 oleh Frank Graham dan Alex van der Eb di Universitas Leiden, Belanda. Lini sel ini diperoleh melalui transformasi sel ginjal embrio manusia dengan fragmen DNA dari adenovirus tipe 5 yang kemudian menghasilkan sel imortal dengan kemampuan proliferasi yang stabil. Seiring waktu, dikembangkan berbagai turunan, termasuk HEK293T, HEK293E, dan HEK293A. Khusus HEK293A, sel ini memiliki karakteristik khusus yaitu lebih melekat pada permukaan kultur dibandingkan varian lain (Graham *et al.*, 1977).



Gambar 2.4.1. Kultur sel HEK293A (Sumber: Niraj & Tulin, 2007)

Sel ini banyak digunakan dalam biologi molekuler, bioteknologi, dan imunologi karena sifatnya yang mudah ditransfeksi, stabil, serta memiliki kemampuan mengekspresikan protein heterolog dalam jumlah tinggi (Faravelli *et al.*, 2021). Selain itu, Dash *et al.*, (2023) juga menyatakan bahwa sel HEK293A dikenal dapat dipelihara dengan mudah dalam kultur *in vitro*, baik dalam kondisi *adherent* maupun *suspension* (dengan adaptasi tertentu). Keunggulan utama

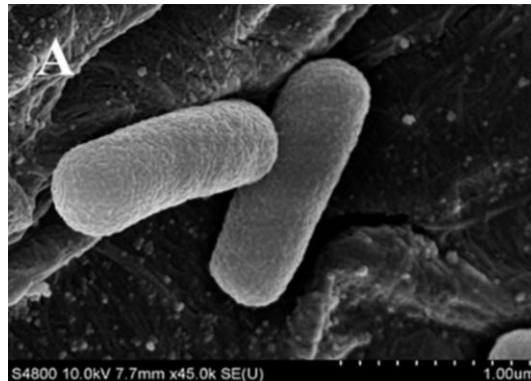
HEK293A adalah efisiensinya dalam memfasilitasi produksi protein yang memerlukan modifikasi pascatranslasi (post-translational modification), seperti glikosilasi, fosforilasi, atau pembentukan ikatan disulfida yang tidak dapat dicapai secara optimal pada sistem prokariotik (Faravelli *et al.*, 2021). Penggunaan HEK293A sebagai inang ekspresi juga dapat memberikan lingkungan yang mendekati kondisi sel manusia, sehingga protein rekombinan yang dihasilkan lebih menyerupai bentuk alaminya di dalam tubuh inang. (Abaandou *et al.*, 2021).

Dash *et al.*, (2023) menyatakan bahwa sel HEK293A dikenal dapat dipelihara dengan mudah dalam kultur *in vitro*, baik dalam kondisi *adherent* maupun *suspension* (dengan adaptasi tertentu). Sifat fleksibel ini menjadi pilihan utama dalam skala penelitian hingga pra-produksi. Sel ini menyediakan platform mamalia yang relevan secara biologis, sehingga hasil penelitian ekspresi kapsid PCV3 tidak hanya bersifat deskriptif, tetapi juga memberikan gambaran mendekati realitas biologis yang dibutuhkan dalam pengembangan vaksin berbasis protein rekombinan (Abaandou *et al.*, 2021).

2.4.2 Sel *Escherichia coli* BL21

Escherichia coli BL21 merupakan bakteri gram negatif berbentuk batang yang hidup secara komensal dalam usus manusia dan hewan berdarah panas. Secara umum, *Escherichia coli* BL21 memiliki struktur khas bakteri Gram-negatif berbentuk batang (basil) dengan ukuran sekitar 1-2 μm panjang dan 0,5 μm (Basavaraju & Gunashree, 2023). Dinding selnya terdiri atas tiga lapisan utama, yaitu membran sitoplasma, lapisan peptidoglikan tipis, dan membran luar yang mengandung *lipopolisakarida* (LPS) yang berfungsi sebagai pelindung sekaligus penentu sifat permeabilitas (Madigan *et al.*, 2019). Di dalam sitoplasma terdapat

ribosom 70S yang berperan aktif dalam sintesis protein serta nukleoid yang membawa kromosom sirkular tunggal berukuran $\pm 4,6$ Mbp (Feijoo-Siota *et al.*, 2017).



Gambar 2.4.2. Sel Bakteri *Escherichia coli* BL21 (Sumber: Xu *et al.*, 2021)

Menurut Jeong *et al.*, (2018) klasifikasi dari *Escherichia Coli* BL21 adalah sebagai berikut:

Domain	: Bacteria
Filum	: Proteobacteria
Kelas	: Gammaproteobacteria
Ordo	: Enterobacterales
Famili	: Enterobacteriaceae
Genus	: <i>Escherichia</i>
Spesies	: <i>Escherichia coli</i>
Strain	: BL21

Bakteri ini banyak digunakan dalam bioteknologi modern khususnya sebagai sistem inang untuk ekspresi protein rekombinan karena memiliki karakteristik yang sesuai, antara lain yaitu rendahnya beberapa protease endogenik, seperti Lon dan OmpT yang dapat mendegradasi protein hasil ekspresi (Xu *et al.*, 2021). Dengan demikian, protein rekombinan dapat terakumulasi dalam jumlah

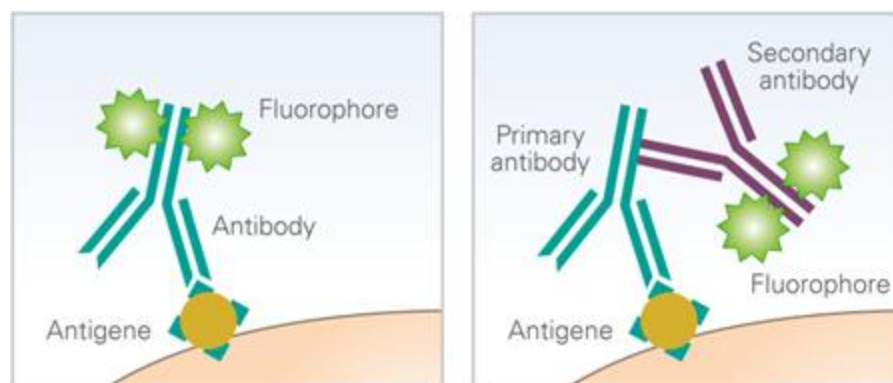
tinggi tanpa mengalami degradasi berlebihan. Selain itu, BL21 dikenal memiliki kapasitas translasi yang efisien serta dapat mentoleransi ekspresi protein asing dalam kadar tinggi, bahkan pada protein yang cenderung membentuk inklusi (Du *et al.*, 2021). Faktor ini sangat penting dalam penelitian vaksin berbasis protein rekombinan, karena potensinya dalam produksi antigen dalam skala laboratorium dengan biaya yang relatif rendah dan waktu yang singkat (Safitri *et al.*, 2024). Dari sudut pandang teknis, Du *et al.*, (2021) juga menyatakan bahwa *E.coli* BL21 memiliki kelebihan yaitu pertumbuhan yang cepat, kebutuhan media yang sederhana, dan kemampuan menghasilkan protein dalam jumlah besar. Hal ini menjadikan BL21 sebagai sistem inang ekspresi prokariotik yang ideal untuk tahap awal eksplorasi antigen. Meskipun ekspresi dalam *E. coli* BL21 tidak dapat menyediakan modifikasi pascatranslasi yang kompleks seperti pada sel mamalia, penggunaan BL21 dapat digunakan untuk memproduksi protein rekombinan dalam skala besar sebelum dilakukan analisis lebih lanjut pada sistem mamalia (Lozano Terol *et al.*, 2021).

2.5 Metode Uji Immunogenisitas

2.5.1 *Immunofluorescence Assay*

Immunofluoresense Assay (IF Assay) merupakan teknik deteksi antigen dalam sel atau jaringan dengan memanfaatkan antibodi berlabel fluoresen. Prinsip dasarnya adalah pengikatan spesifik antara antibodi dengan epitop target, kemudian sinyal fluoresen dari fluorofor dapat diamati melalui mikroskop fluoresensi atau konfokal (Alhabbab, 2018). Dalam aplikasinya, imunofluoresensi terbagi menjadi dua yaitu langsung (*direct*) dan tidak langsung (*Indirect*). Imunofluoresensi langsung menggunakan antibodi primer yang dikonjugasikan langsung dengan

fluorofor. Sedangkan Imunofluoresensi tidak langsung menggunakan antibodi primer yang mendeteksi antigen kemudian diikuti antibodi sekunder berlabel fluoresen (Becheva et al., 2018). Metode tidak langsung lebih umum digunakan karena dapat memberikan amplifikasi sinyal yang lebih kuat dan tepat dari 2 ikatan antibodi yang digunakan. Teknik ini sangat bermanfaat untuk memverifikasi protein rekombinan di dalam sel, memastikan ekspresi antigen, serta memberikan informasi mengenai distribusi subseluler (Yao et al., 2021).

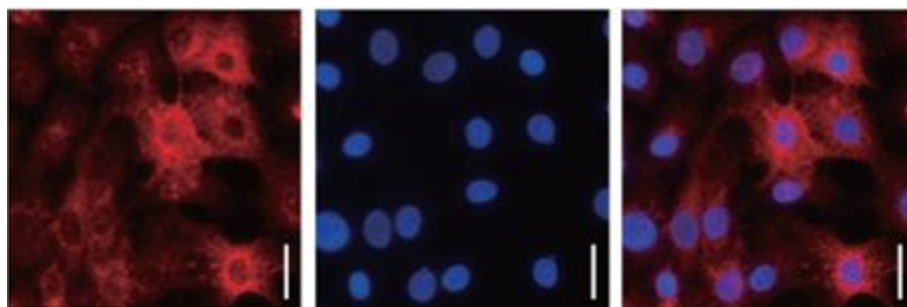


Gambar 2.5.1. Prinsip metode *Immunofluorescence*. Keterangan: (A) Secara langsung (Direct), dan (B) tidak langsung (Indirect) (Sumber: Lee et al., 2020)

Joshi & Yu (2017) mengungkapkan bahwa selain prinsip pengikatan spesifik antigen-antibodi, dasar lain dari teknik imunofluoresensi adalah kemampuan fluorofor untuk menyerap cahaya pada panjang gelombang tertentu dan memancarkan cahaya pada panjang gelombang yang lebih panjang. Pemilihan fluorofor dengan spektrum emisi yang berbeda juga memungkinkan deteksi simultan beberapa antigen dalam satu preparat (*multiplexing*). Dengan demikian, imunofluoresensi tidak hanya memberikan informasi mengenai keberadaan protein, tetapi juga memungkinkan analisis ko-lokalisasi antarprotein di dalam sel. Aspek penting lainnya adalah preservasi struktur seluler melalui fiksasi kimiawi, yang

menjaga antigen dan mempertahankan distribusi subseluler protein rekombinan sehingga hasil pengamatan lebih representatif (Yao et al., 2021).

Piña *et al.*, (2022) menjelaskan bahwa secara teknis prosedur imunofluoresensi mencakup beberapa tahapan penting yaitu fiksasi, permeabilisasi, blocking, inkubasi dengan antibodi primer, inkubasi dengan antibodi sekunder berlabel fluorofor (untuk metode tidak langsung), dan terakhir mounting sebelum pengamatan dengan mikroskop fluoresensi. Fiksasi dapat menggunakan formaldehida untuk mengikat protein dengan stabil, sedangkan permeabilisasi (misalnya dengan Triton X-100 atau Polyetilenimine) diperlukan agar antibodi dapat masuk ke dalam sel. Proses blocking menggunakan serum atau protein lain bertujuan untuk mengurangi ikatan non-spesifik sehingga meningkatkan spesifisitas hasil deteksi. Setelah itu akan diberikan antibodi primer untuk pengikatan dengan antigen. Dilanjut dengan antibodi sekunder untuk pengikatan dengan antibodi primer. Langkah terakhir adalah pewarnaan dengan DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) untuk melihat sel yang masih aktif atau hidup.



Gambar 2.5.2. Contoh hasil dari pengujian *Immunofluorescence* yang menunjukkan; (A) Ekspresi Protein Antigenik, (B) Sel yang masih aktif/hidup, dan (C) Gabungan 2 foto (Sumber: Tada *et al.*, 2016).

Interpretasi hasil imunofluoresensi didasarkan pada lokalisasi sinyal. Sinyal merah yang tersebar di sitoplasma menunjukkan ekspresi protein target pada kompartemen sitoplasmik, sedangkan sinyal biru yang terlokalisasi pada inti hanya

berfungsi sebagai penanda struktur inti sel yang masih aktif. Ketika kedua gambar sinyal fluoresen digabungkan (*merged image*), pola tumpang tindih antara merah dan biru menghasilkan gambaran menyeluruh mengenai ekspresi dan lokalisasi protein. Apabila sinyal merah mengelilingi atau tersebar di sekitar sinyal biru, maka terdapat indikasi bahwa ekspresi protein rekombinan berlangsung di sitoplasma. Sebaliknya, jika sinyal merah berada di dalam nukleus maka protein berhasil diekspresikan dari dalam inti sel dan hasil semacam ini adalah hasil yang dibutuhkan dalam riset ekspresi protein menggunakan metode Immunofluorescence Staining Assay (Tada *et al.*, 2016).

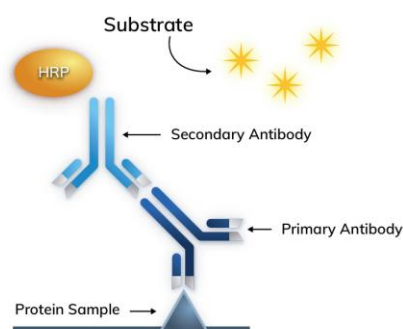
Keberhasilan uji imunofluoresensi dipengaruhi oleh berbagai faktor yang menentukan kualitas sinyal serta spesifisitas deteksi antigen seperti kualitas antibodi, cairan permeabilisasi, cairan fiksasi, dan kondisi kultur sel (Im *et al.*, 2019). Kualitas antibodi primer dan sekunder berpengaruh kepada sinyal yang dihasilkan, termasuk afinitas dan spesifisitasnya terhadap epitop target (Alhabbab, 2018). Komponen untuk permeabilisasi sel juga berpengaruh dalam mempertahankan struktur protein sekaligus memungkinkan akses antibodi ke dalam kompartemen seluler. Pemilihan metode fiksasi seperti formaldehida atau metanol dapat memengaruhi distribusi dan intensitas sinyal (Yao *et al.*, 2021). Kemudian jenis fluorofor yang digunakan akan mempengaruhi kualitas visualisasi gambar hasil. Selain itu, yang terpenting adalah kondisi kultur sel karena tingkat ekspresi protein rekombinan sangat bergantung pada viabilitas dan aktivitas metabolik sel inang (Joshi & Yu, 2017).

2.5.2 Western Blot

Western blot merupakan metode analisis protein yang menggabungkan separasi, transfer, dan deteksi spesifik (Hnasko & Robert, 2015). Prinsip dasarnya adalah pemisahan protein berdasarkan ukuran menggunakan SDS-PAGE, kemudian protein yang terpisah ditransfer ke membran (nitroselulosa atau PVDF). Setelah itu, membran diinkubasi dengan antibodi primer yang mengenali antigen target, lalu diikuti oleh antibodi sekunder yang terkonjugasi dengan enzim seperti peroxidase. Aktivitas enzim ini menghasilkan sinyal yang dapat divisualisasi, baik secara kromogenik, kimiluminesen, maupun fluoresen (F. Wang et al., 2022). Teknik ini memiliki sensitivitas tinggi dan mampu memberikan informasi kuantitatif maupun kualitatif mengenai keberadaan, ukuran molekuler, serta tingkat ekspresi protein target. Dalam studi ekspresi protein rekombinan, *Western blot* berperan untuk mengonfirmasi keberhasilan translasi protein, verifikasi spesifisitas, serta mengevaluasi struktur protein setelah proses ekspresi (Begum et al., 2022).

Metode *Western blot* bekerja melalui tahapan yang relatif sistematis. Pertama, protein dipisahkan berdasarkan ukuran dengan bantuan *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis* (SDS-PAGE). SDS berperan dalam memberikan muatan negatif seragam pada protein sehingga migrasi hanya dipengaruhi oleh ukuran molekul, bukan oleh bentuk atau muatan. Selanjutnya, protein yang telah terpisah dialihkan ke membran padat, umumnya nitroselulosa atau PVDF (*Polyvinylidene Fluoride*) yang memiliki afinitas tinggi terhadap protein. Proses transfer ini memungkinkan protein bertahan dalam posisi relatif sama seperti pada gel, namun lebih mudah diikat oleh antibodi selama tahap deteksi (Kurien, 2021).

Tahap terpenting dalam metode Western Blot ini adalah pewarnaan protein. Tahapnya dimulai dengan *blocking* menggunakan protein non-spesifik seperti susu skim dan PBS untuk menutupi situs ikatan bebas dan mencegah sinyal latar belakang (Abdizadeh *et al.*, 2015). Antibodi primer yang spesifik terhadap protein target kemudian diinkubasikan, diikuti oleh antibodi sekunder yang dikonjugasikan dengan komponen enzimatik (misalnya HRP atau alkaline phosphatase). Aktivitas enzim ini memunculkan sinyal yang dapat dideteksi melalui metode kemiluminesensi, kromogenik, atau fluoresensi tergantung sensitivitas dan tujuan eksperimen (Litovchick, 2019). Kekuatan Western blot terletak pada kombinasi spesifisitas antigen-antibodi dengan resolusi molekuler SDS-PAGE sehingga mampu membedakan protein target dari sampel yang terdapat banyak sekali protein di dalamnya (F. Wang *et al.*, 2022).



Gambar 2.5.3. Reaksi protein (antigen) dengan antibodi dan substrat (Sumber: Hnasko & Robert, 2015)

Keberhasilan Western blot dipengaruhi oleh beberapa faktor seperti kualitas sampel protein, kualitas SDS-Page, kualitas antibodi, dan kualitas mesin pemindai membran. Kualitas sampel protein harus terjaga agar tidak terdegradasi oleh protease. Kemudian kualitas SDS-Page dan proses transfer ke membran perlu dilakukan secara hati-hati karena protein sangatlah sensitif terhadap sentuhan

mekanik ataupun yang sejenisnya (Kurien, 2021). Kualitas antibodi yang digunakan tentunya memberikan pengaruh yang signifikan pengikatan antigen serta pemunculan warna. Ketiga, blocking yang memadai diperlukan untuk menekan sinyal latar belakang tanpa menurunkan sensitivitas (Litovchick, 2019). Terakhir, sistem visualisasi perlu diatur dengan benar agar menghasilkan sinyal jelas tanpa *overexposure* (Hnasko & Robert, 2015).

BAB III METODE PENELITIAN

3.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian deskriptif kualitatif yang didesain sebagai *true experimental* dengan *post-test only control group* yang terdiri atas sampel positif sebagai subjek penelitian dan dikomparasi dengan sampel negatif. Dengan ini maka pada penelitian ini hanya ada dua kelompok yaitu:

1. Sampel Positif

Sampel positif adalah kelompok sampel yang diinsersi dengan fragmen gen pVAX.PCV. Kelompok ini merepresentasikan kondisi sel yang mengalami respon ekspresi protein pasca-transformasi atau pasca-transfeksi oleh plasmid DNA tersebut. Jumlah sampel pada kelompok ini hanya 2 sampel yang didapatkan dari hasil *screening* koloni positif dengan metode *Rapid Size Assay*.

2. Sampel Negatif

Sampel negatif adalah kelompok sampel yang diinsersi fragmen plasmid pVAX1 saja, tidak mengandung gen PCV3. Kelompok ini merepresentasikan kondisi sel yang tidak mengalami respon ekspresi protein pasca-transformasi atau pasca-transfeksi oleh plasmid DNA tersebut. Jumlah sampel pada kelompok ini hanya 1 karena digunakan sebagai pembanding (kontrol) dengan sampel positif.

3.2 Variabel Penelitian

Penelitian ini menggunakan tiga variabel yang terdiri dari:

1. Variabel bebas dalam penelitian ini adalah Plasmid DNA pVAX1.PCV3 dengan sekuen Tag di ujungnya berupa V5
2. Variabel terikat dalam penelitian ini adalah protein antigenik PCV3 yang dihasilkan oleh sistem inang HEK293A dan *E.coli* BL21.

3. Variabel terkendali yaitu kultur sel HEK293A dengan media Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) 10% FBS serta 1% antibiotik (*penisilin-streptomisin*) dan diinkubasi dalam inkubator CO₂ 5% dengan suhu 37°C. Selain itu juga terdapat bakteri *E.coli* BL21 dengan media LB Broth dan antibiotik kanamycin. Kemudian juga terdapat lama inkubasi yang dikendalikan.

3.3 Waktu dan Tempat

Penelitian dilaksanakan pada bulan Juli hingga Agustus 2025 di Laboratorium *Animal Cell Culture, Biotechnology International Graduate Progame, School of Bioresource and Technology*, King Mongkut's University of Technology Thonburi, 49 Soi Thian Thale 25, Bang Khun Thian Chai Thale Road, Tha Kham, Bang Khun Thian, Bangkok, Thailand.

3.4 Alat dan Bahan

3.4.1 Alat

Alat-alat yang digunakan pada penelitian ini adalah; *Laminar Air Flow* (LAF), Inkubator CO₂ 5%, Mikroskop Inverted, Mikroskop Fluoresense, Autoklaf, Oven, Timbangan Analitik, 12-Wells Plate, Sentrifuge Suhu, *Thermal Cycler* (C1000 Touch BIO-RAD), *Nucleic Acid Electrophoresis* (BIO-RAD), Pembaca Gel Elektroforesis (Azure Biosystems C Series), Membran Nitroselulosa (Western Blot), Spektrofotometer, *Hot Plate Stirrer*, *Shaker Incubator with Thermal*, *Head to Tail Shaking*, Tube (1.5 ml, 15 ml, dan 50 ml), tip pipet (putih, kuning, dan biru), *Vertical Gel Electrophoresis System* (BIO-RAD), Pemindai hasil Western Blot (Thermo Scientific Inc.) , pipet mikro (0.2 µl - 1000 µl), *Column* (alat purifikasi), *Water Bath*, *Sample Heater*, Refrigerator, Freezer, Nanodrop (Thermo Scientific

Inc.), Cawan petri, tabung erlenmeyer (250 ml & 2 liter), rak tube, hand glove, tissu, bunsen, karet, plastik, dan pulpen.

3.4.2 Bahan

Bahan-bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah kultur sel HEK293A, kultur bakteri *E.coli* DH5 α , kultur bakteri *E.coli* BL21, Kit PCR (New England), Plasmid DNA pVAX1, Primer *Forward* New-5' Flanking, Primer *Reverse* Stop-RE, *Epitope Tag* V5, IPTG (Isopropil-B-D-Thiogalactoside), *Reagent* Cell Lytic B, Lysozyme, Enzim Benzonase, Enzim Protease Inhibitor Cocktail, Enzim Restriksi (HindIII&NotI), Enzim Ligase (T4 DNA Ligase), Antibodi Primer (Mouse Anti-V5), Antibodi Sekunder (Anti Mouse IgG Alexa Fluor), pewarna DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole), Kit Ekstraksi & Purifikasi Plasmid (TIANprep Rapid Mini Plasmid Kit - TIANGEN), 1X TAE (Tris-base, Asetic Acid, dan 0.5 M EDTA pH 8.0), Gel Elektroforesis, Gel SDS (Tris-HCl, 30% Bis-Acrylamide, 10% SDS, 10% APS, TEMED), *Ethidium Bromide* (EtBr), Media DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) High Glucose, Susu Skim 5%, Larutan Peroksida, Larutan Luminol, TMB (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine) Substrat, *Fetal Bovine Serum* (FBS), *Phosphate Buffer Saline* (PBS), Antibiotik Penisilin Steptomisin, Trypsine, DTT (dithiothreitol), Media Luria-Bertani (LB) Broth, Antibiotik Kanamysin, 1X Loading Dye, TBST (Tris Buffered Saline dan Tween), RIPA (Tris, NaCl, Glycerol, Nohidet P-Lic, EDTA, Protease Inhibitor), Poly-L-Lysin, Polyetilenimine (PEI), Imidazole, MES (2-Morpholinoethanesulphonic acid) Buffer, Alkohol 70%, Es Batu, dan Air.

3.5 Prosedur Penelitian

3.5.1 Preparasi Ruang, Alat, dan Bahan

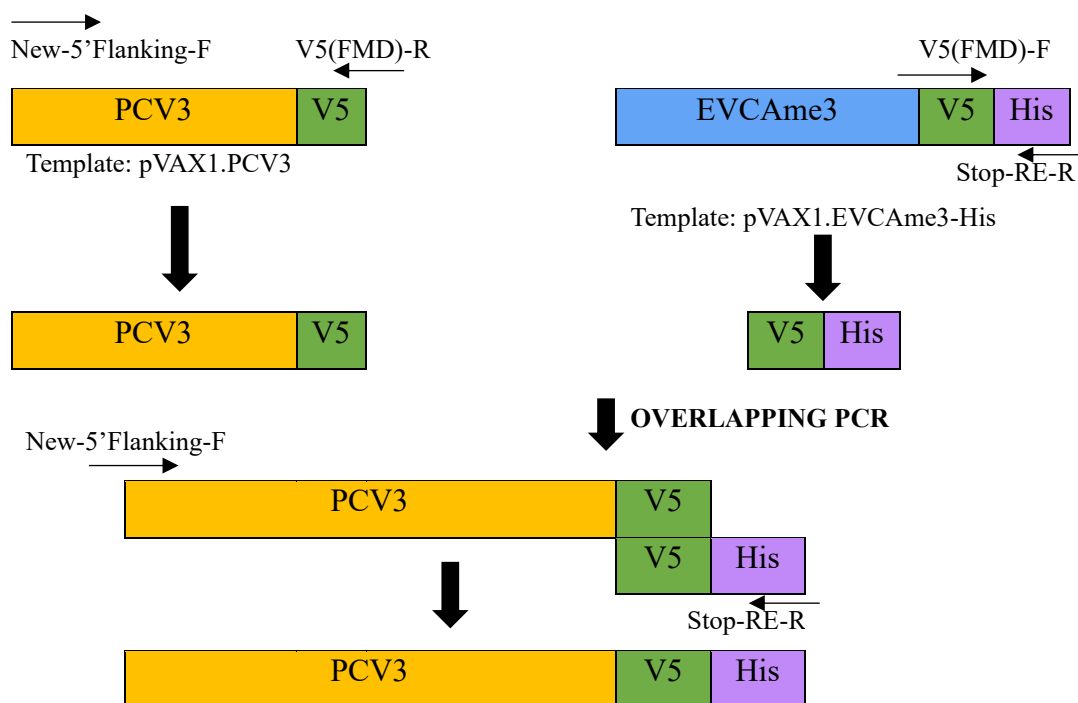
Preparasi ruang, alat, dan bahan dilakukan untuk menghindari kontaminasi yang berdampak pada penelitian (kultur sel maupun kultur bakteri). Untuk kultur sel dan bakteri dibedakan ruangnya untuk menghindari kontaminasi. Setiap rangkaian kegiatan penelitian yang berhubungan dengan kultur sel dilakukan di dalam *Laminar Air Flow* (LAF). Lampu UV pada LAF dinyalakan sebelum pemakaian, yaitu 30 menit untuk LAF sel dan 15 menit untuk LAF bakteri. Alkohol selalu digunakan untuk sterilisasi sebelum bekerja dan setelah bekerja. Kemudian semua peralatan yang akan digunakan dimasukkan ke dalam *autoclave* selama 30 menit dengan tekanan 15 psi dan suhu 121°C, setelah itu dikeringkan dengan oven selama kurang lebih 3 hari.

Bahan-bahan yang akan digunakan dibuat stoknya terlebih dahulu. Medium DMEM dibuat dengan melarutkan 19.5 gram bubuk DMEM bersama DI (Deionized Water) sebanyak 1 liter dan diaduk dengan stirer hingga sepenuhnya larut. Dipastikan medium DMEM di akhir memiliki tingkat keasaman 7.2-7.4 dengan cara ditambahkan NaHCO₃ secara perlahan. Kemudian media tersebut disterilkan menggunakan *filter membrane* dengan porositas 0,22 µm. Untuk media pertumbuhan bakteri, dilarutkan LB bubuk 55 gram dengan DI (Deionized Water) 2.2 Liter dan diaduk menggunakan stirer. Setelah itu disterilkan dengan autoklaf pada suhu 121°C dan tekanan 15 psi. Adapun gel elektroforesis dibuat dengan melarutkan serbuk agarose dan larutan 1X TAE dengan perbandingan 1:100. Campuran ini kemudian diaduk di dalam oven dengan daya 350-450 Watt selama 2 menit.

3.5.2 Konstruksi fragmen gen

3.5.2.1 Desain Konstruksi Genetik PCV3

Konstruksi genetik diawali dengan desain yang telah disediakan oleh peneliti sebelumnya (Butkhot *et al.*, 2025; Polyiam *et al.*, 2021; Rattanaamnuaychai *et al.*, 2018). Desain konstruksi dapat dilihat pada gambar berikut ini:



Gambar 4. Desain konstruksi genetik PCV3

3.5.2.2 Amplifikasi Fragmen Genetik

Proses konstruksi dimulai dengan amplifikasi fragmen gen *template* pVAX1.PCV3 dan pVAX1.EVCVame3-His. Kemudian dilakukan *sequencing* pada kedua fragmen gen tersebut dengan primer telah didesain dan disediakan oleh peneliti sebelumnya (Polyiam *et al.*, 2021) yaitu New-5'Flanking-F dan Stop-RE-R (Lampiran 6). Hasil amplifikasi kedua fragmen tersebut digabungkan (*Overlapping*) dan didapatkan hasil fragmen genetiknya yaitu PCV3.V5-His. Gel

elektroforesis yang digunakan untuk *Overlapping* dibuat dengan menyambungkan 2-3 sumuran gel agar pita DNA yang terbentuk dapat dipotong dan dipurifikasi.

Tahapan selanjutnya yaitu purifikasi fragmen gen PCV3.V5-His dengan *Midi Plasmid Kit* dari ThermoFisher Scientific. Prosesnya diawali dengan menimbang massa gel yang diambil untuk diselaraskan dengan buffer PC yang akan ditambahkan. Kemudian gel tersebut dilelehkan dalam suhu 50°C dan dimasukkan ke *column*. Setelah itu disentrifuge selama 1 menit dengan kecepatan 12.000 rpm. Hasil saringan *column* dibuang dan ditambahkan buffer PW sebanyak 600 µl lalu disentrifuge lagi selama 1 menit dengan kecepatan 12.000 rpm. Kemudian residu yang terdapat di dalam *column* dibuang dan ditambahkan air sebanyak 40 µl lalu disentrifuge selama 10 detik dengan kecepatan 12.000 rpm. Hasil purifikasi telah siap untuk dipotong menggunakan enzim restriksi.

Langkah selanjutnya yaitu pemotongan dengan enzim restriksi yaitu HindIII-HF dan NotI-HF (New England Inc.). Komposisi yang digunakan adalah Fragmen Gen (hasil purifikasi sebelumnya) 40 µl, 10X NE Buffer 5 µl, Enzim Restriksi 2 µl (masing-masing enzim 1 µl), dan Air 3 µl. Komponen-komponen tersebut dihomogenkan dan diinkubasi selama 3 jam pada suhu 37°C menggunakan *Thermal Cycler* (BIO-RAD). Setelah itu dilakukan purifikasi hasil restriksi (fragmen gen) dengan menghomogenkan fragmen gen tersebut dengan buffer PC di dalam *column* sebanyak 50 µl. Kemudian diinkubasi selama 2 menit dan disentrifuge 1 menit pada kecepatan 12.000 rpm. Lalu ditambahkan buffer PW 600 µl dan disentrifuge 1 menit pada kecepatan 12.000 rpm. Air sebanyak 35 µl ditambahkan dan disentrifuge kembali pada kecepatan 12.000 rpm selama 10 detik.

Langkah terakhir adalah menghitung konsentrasi DNA dengan alat Nano-drop (Thermo Scientific).

Fragmen gen hasil restriksi yang telah dipurifikasi kemudian digabungkan dengan vektor/plasmid pVAX1 dengan enzim ligase. Enzim ligase yang digunakan adalah T4 DNA Ligase. Komposisi yang digunakan untuk proses ligase yaitu vektor/plasmid pVAX1 (panjang 3 Kb), Insert DNA (hasil purifikasi, panjang 0,9 Kb), dan enzim T4 DNA Ligase. Komponen-komponen tersebut dihomogenkan dan diinkubasi selama semalam pada suhu 4°C. Setelah itu, dilanjutkan kloning menggunakan inang *E.coli* DH5α dengan metode *Heat-Shock*. Selanjutnya diinkubasi selama 2 jam pada suhu 37°C dan menggunakan *inkubator shaker*. Tahap berikutnya yaitu penanaman bakteri *E.coli* dalam cawan petri dan diinkubasi semalaman pada suhu 37°C. Pada tahap ini media pertumbuhan yang digunakan adalah LB (Luria-Bertani) Broth yang di dalamnya terdapat Antibiotik spesifik yaitu Kanamysin.

3.5.2.3 *Rapid Size Assay*

Tahapan penting dalam konstruksi genetik adalah *Rapid Size Assay*. Tahap ini bertujuan untuk menyeleksi koloni bakteri *E.coli* DH5α yang mengandung fragmen gen pVAX1.PCV3. Prosesnya diawali dengan menumbuhkan bakteri pada cawan kisi (*grid plate*) dengan masing-masing kisi terisi oleh satu koloni. Koloni-koloni dalam kisi tersebut kemudian diinkubasi dalam suhu 37°C selama semalam (16-18 Jam). Setelah itu masing-masing koloni diambil satu titik saja untuk dicampurkan dengan *Loading dye* dan dilihat panjang DNA nya menggunakan elektroforesis. Koloni bakteri yang memiliki panjang DNA 0,9 Kb maka itulah koloni yang positif atau terinsersi oleh fragmen gen pVAX1.PCV3.

Proses berikutnya yang dilakukan adalah inokulasi sampel koloni positif ke dalam media LB Broth 5 ml ditambah dengan Antibiotik Kanamysin 5 µl dan diinkubasi semalaman pada suhu 37°C dengan *Shaker Incubator*. Setelah itu dilakukan purifikasi dengan kit dari TIANGEN. Prosedurnya diawali dengan pencampuran buffer P1, P2, dan P3 dengan pellet sel bakteri hasil sentrifugasi. Kemudian dimasukkan kedalam *column* dan disentrifugasi hingga komponen-komponen selain plasmid pVAX1.PCV3 terlepas. Setelah itu ditambahkan buffer PWT 600 µl dan diulang sekali lagi. Residu di dalam *column* dibuang dengan disentrifugasi tanpa tambahan apapun. Tahap terakhir adalah penambahan air 50 µl dan disentrifugasi selama 2 menit pada kecepatan 12.000 rpm. Setelah itu akan didapatkan ekstrak plasmid pVAX1.PCV3 yang murni dan dapat dilanjutkan ke tahap validasi akhir yaitu *Enzyme Digest Assay*. Ekstrak plasmid ini kemudian dihitung konsentrasi DNA nya dengan alat nano-drop.

3.5.2.4 Enzyme Digest Assay

Konfirmasi keberhasilan konstruksi genetik pVAX1.PCV3 diperkuat dengan pengujian *Enzyme Digest Assay* untuk memvalidasi keberhasilannya. Prosesnya diawali dengan pencampuran fragmen gen pVAX1.PCV3 dengan enzim restriksi HindIII dan NotI, komponen ini dinamakan dengan *Cut*. Komposisi ini kemudian diinkubasi pada suhu 37°C agar terpisah/terpotong antara fragmen gen dan plasmid nya. Disamping itu, disiapkan juga plasmid pVAX1.PCV3 yang tidak dipotong dengan enzim restriksi, komponen ini dinamakan dengan *Uncut*. Kedua jenis sampel tersebut kemudian dicek panjang DNA nya dengan elektroforesis. Jika tahap ini selesai maka plasmid pVAX1.PCV3 dapat diinsersi ke dalam sistem inang *Escherichia coli* BL21 dan *Human Embryonic Kidney* 293A (HEK293A).

3.5.3 Transfeksi ke Sel HEK293A

Transfeksi ke inang HEK293A (eukariotik) merupakan tahap untuk menguji plasmid pVAX1.PCV3 agar dapat mengekspresikan protein kapsid. Tahap ini dimulai dengan menyiapkan kultur sel HEK293A dalam Flask T75 dengan Media Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) ditambahkan dengan 10% *Fetal Bovine Serum* (FBS) dan 1% Antibiotik Penicillin dan Streptomycin. Sel dikultur hingga konfluensinya mencapai 100% dalam keadaan satu lapis pertumbuhan (*monolayer*). Setelah tercapai konfluensinya, sel dicuci dan dipindah ke dalam sumuran 12-Wells Plate. Untuk sumuran yang digunakan sebagai tempat sel yang akan diuji menggunakan pengujian *Imunofluoresense Staining Assay* maka sebelumnya harus dilapisi dulu dengan Poly-L-Lysin. Poly-L-Lysin ini akan melapisi permukaan plate dengan muatan positif, sehingga sel bermuatan negatif bisa menempel kuat, tidak lepas saat pencucian, dan distribusinya rata, maka hasil imunofluoresensi akan menjadi lebih jelas dan terukur (Zhu et al., 2023). Setelah itu sel ditanam di sumuran tersebut dengan konfluensi awal sekitar 2,5% saja dari 100% konfluensi awal (Flask T75). Setelah penanaman ini maka kultur sel diinkubasi hingga konfluensinya mencapai 100% dalam 12-Wells Plate.

Transfeksi plasmid DNA ke dalam sel HEK293A dilakukan setelah sel tercapai konfluensi 100%. Untuk memudahkan transfeksi, maka digunakan Polyetilenimine (PEI). PEI berfungsi sebagai agen transfeksi non-viral yang mengikat DNA plasmid melalui interaksi elektrostatik yang membentuk kompleks *polyplex*. Kompleks ini masuk ke dalam sel lewat endositosis, lalu melepaskan DNA ke sitoplasma melalui *proton sponge effect*. Dengan cara ini, DNA dapat mencapai inti sel dan diekspresikan menjadi protein target (Neuberg & Kichler,

2014). Konsentrasi plasmid DNA yang digunakan adalah 1000 µg per sumuran dengan diberi media DMEM Komplit sebanyak 500 µl. Setelah itu sel diinkubasi dengan suhu 37°C dan CO₂ 5% selama 48 Jam. Jika sudah maka kultur sel yang ditransfeksi dengan plasmid DNA tersebut dapat digunakan untuk pengujian ekspresi protein dengan metode *Imunofluoresense Staining Assay* dan Western Blot.

3.5.4 Transformasi ke *E.coli* BL21

Transformasi ke inang *E.coli* BL21 (prokariotik) merupakan tahap untuk menguji plasmid DNA untuk mengekspresikan protein yang dikode di dalamnya. Tahap ini dimulai dengan memasukkan plasmid DNA ke dalam bakteri menggunakan metode *Heat-Shock*. Proses kultur bakteri dilakukan dengan menyebar bakteri di dalam cawan petri yang berisi media LB dan antibiotik Kanamisin sebagai selektor. Setelah itu, satu koloni bakteri dari cawan petri diambil dan diinokulasikan dengan media LB cair 5 ml dengan antibiotik kanamysin dan diinkubasi sekitar 16-18 jam di dalam *shaker incubator* bersuhu 37°C. Setelah itu inokulum diambil 2 ml dan dimasukkan ke dalam tube yang berisi media LB 20 ml yang disertai antibiotik kanamysin. Inokulum tersebut diinkubasi lagi dengan *shaker incubator* bersuhu 37°C hingga absorbansinya (OD600) mencapai 0,5 hingga 0,6.

Setelah absorbansi mencapai angka tersebut, dilanjutkan dengan induksi IPTG (Isopropil-B-D-Thiogalactoside). IPTG yang diinduksikan memiliki jumlah angka volume yang sama dengan volume inokulum yang tersisa di dalam tube (rasio 1:1000). Jadi misalnya volume inokulum yang tersisa di dalam tube adalah 19 ml maka IPTG yang harus ditambahkan adalah 19 µl. Tahap berikutnya adalah inkubasi dalam *shaker incubator* bersuhu 37°C selama 4 jam dan 24 jam. Jadi pada

saat jam ke-4, inokulum diambil 6 ml untuk dipanen sel nya, dan pada jam ke-24 juga dilakukan hal yang sama. Setelah itu disentrifugasi dengan kecepatan 8,000 rpm selama 5 menit dan ditimbang berat selnya yang mengendap di bawahnya. Berat sel ini diperlukan untuk kalkulasi volume komponen untuk *Cell Lytic* atau Lisis sel. Komponen lisis sel terdiri dari Cell Lytic B, Lysozyme, Benzonase, dan Protease Inhibitor Cocktail. Lalu dihomogenkan 15 menit dengan rotator kemudian disentrifugasi pada kecepatan 12,000 rpm selama 10 menit dengan suhu 4°C. Pellete sel yang terendap di bawah dinamakan dengan *Inclusion Body* sedangkan supernatannya disebut *Soluble Protein*. Kedua macam inilah yang nantinya akan dipakai untuk pengujian ekspresi protein dengan metode Western Blot.

3.5.5 Ekspresi Protein

3.5.5.1 Immunofluorescence Assay

Immunofluorescence Assay pada sel HEK293A yang ditransfeksi plasmid DNA PCV3 dengan V5-Tag bekerja dengan prinsip pengikatan antibodi spesifik. Antibodi primer (Mouse Anti-V5) mengenali tag V5 pada protein hasil ekspresi lalu diikat oleh antibodi sekunder (Donkey-Anti Mouse IgG Alexa Fluorosay). Sementara itu, pewarna DAPI digunakan untuk menandai inti sel hidup dengan fluoresensi biru. Pada pengamatannya, sel yang berwarna biru menunjukkan adanya sel yang aktif, sedangkan sinyal merah menandakan ekspresi protein PCV3 yang berhasil dikenali antibodi secara spesifik. Tahapnya dimulai dengan pemberian Formaldehyde 1% sebanyak 1 ml dan diinkubasi selama 10 menit di suhu ruang. Kemudian diberikan Methanol 90% sebanyak 1 ml dan diinkubasi selama 5 menit di suhu 4°C. Fetal Bofine Serum (FBS) 20% sebanyak 1 ml digunakan untuk *blocking* sel sebelum diberikan antibodi primer (Mouse Anti-V5) yang dilarutkan

dalam PBS (*Phosphate Buffer Saline*) dengan rasio 1:2000 dan diinkubasi selama 2 jam di suhu ruang. Antibodi sekunder (Donkey-Anti Mouse IgG Alexa Fluor) ditambahkan dengan rasio larutan 1:1000 (Antibodi&PBS) dan diinkubasi selama 1 jam dalam ruangan yang gelap. Setelah itu ditambahkan pewarna DAPI yang dilarutkan dalam PBS dengan rasio 1:1000 dan diinkubasi selama 15 menit. Terakhir, sampel dicuci dengan PBS sebanyak 1 ml dan dapat dilihat ekspresi proteinnya menggunakan Mikroskop Fluoresensi yang ditandai dengan pendaran warna merah dari nukleus sel.

3.5.5.2 *Western Blot*

Pengujian ekspresi protein menggunakan metode *Western Blot* ditujukan untuk mengetahui keberhasilan sistem sintesis protein di dalam sel prokariotik dalam mengekspresikan protein yang dikode oleh plasmid PCV3 dengan V5-Tag yang kita transformasikan. Langkah awalnya adalah dengan menyebarkan protein-protein yang tersedia di dalam sampel sesuai dengan berat molekulnya menggunakan perangkat SDS-Page. Pada tahap ini, semua protein yang berada di dalam sampel akan terlihat, termasuk juga protein V5 yang ditargetkan. Namun, tidak bisa dilihat secara spesifik protein V5 itu berada. Maka dibutuhkan pengikatan spesifik protein tersebut dengan cara mengikat protein tersebut dengan antibodi (karena protein V5 adalah protein antigenik). Antibodi yang digunakan meliputi antibodi primer (Mouse Anti-V5) dan antibodi sekunder (Donkey-Anti Mouse IgG Alexa Fluor). selanjutnya bisa dilihat bahwa sistem inang yang digunakan dalam penelitian ini benar-benar mampu mengekspresikan protein yang dimaksud, ditunjukkan dengan garis gelap yang terdapat di membran *Western Blot*.

Pengujian *Western Blot* pada penelitian ini menguji ekspresi protein antara HEK293A dan *E.coli* BL21 dengan preparasi yang berbeda. Pada sel HEK293A, tahapannya diawali dengan memisahkan antara media DMEM lama dengan sel yang berada di dalam sumuran. Media DMEM dipisah dan ditempatkan di dalam Tube 1,5 ml. Kemudian untuk selnya ditambahkan RIPA 50 μ l untuk melepaskannya dari sumuran atau *wells*. Sel tersebut ditempatkan di Tube 1.5 ml dan ditambahkan RIPA 100 μ l. Sampai disini maka sampel protein HEK293A untuk Western Blot terdapat dua yaitu berasal dari medium lama dan dari selnya. Adapun untuk *E.coli* BL21, sampel yang digunakan adalah *Soluble Protein* yang telah disiapkan sebelumnya.

Tahapan SDS-Page diawali dengan pembuatan Gel SDS dengan 30% Bis-Acrylamide, 0.5 M Tris-HCl (pH 6.8), 1.5 M Tris-HCl (pH 8.8), 10% SDS, 10% APS, TEMED, dan Air. Pembuatan gel diawali dengan menambahkan komponen diatas sebagai *Resolving* 12% kemudian ditimpa dengan *Stacking* 4% sebagai gel yang tercetak dengan cetakan lubang SDS-Page. Sampel yang dimasukkan ke dalam gel diberi 1X Loading Dye serta konsentrasi protein yang diambil hanya 10 μ g untuk sampel dengan konsentrasi protein lebih dari 1 mg/ml dan 1 μ g untuk sampel dengan konsentrasi protein kurang dari 1 mg/ml. Setelah itu, proses elektroforesis dapat dijalankan dengan tegangan listrik 150 V selama 50 menit. Transfer protein dari gel ke membrane dilakukan setelah proses elektroforesis selesai. Gel SDS berisi protein direndam dengan Transfer Buffer lalu diapitkan dengan dua kertas tebal dan membrane western blot dengan susunan seperti sandwich. Kemudian diberi tekanan listrik dengan tegangan 25 Volt selama 30 menit.

Setelah selesai, protein yang awalnya berada di gel SDS akan berpindah ke membrane. Membrane diblokade areanya dengan Susu Skim 5% dan direndam dengan *shaker* selama 10-15 menit. Selanjutnya diberi antibodi primer (Mouse Anti-V5) yang telah dilarutkan dengan Susu Skim 5% dengan rasio 1:2000 dan digoyangkan dengan *shaker* selama 1 jam. Kemudian membrane dicuci dengan PBST (PBS+Tween) dan Antibodi sekunder (Donkey-Anti Mouse IgG Alexa Fluor) diberikan setelahnya dengan rasio 1:10.000 lalu digoyangkan selama 1.5 jam di *shaker*. Membrane tersebut dicuci lalu diberikan larutan peroksida dan substrat kemiluminesense (WESTAR SUPERNOVA, Cyanagen) sebanyak 1 ml kemudian diinkubasi selama 5 menit dalam ruang yang gelap. Setelah itu, *membrane* dapat dipindai hasilnya dengan Alliance MINI HD9 AUTO Western Blot Imaging System (Uvitec Mini HD9, BioSPX) dan dianalisis berdasarkan ketebalan garis, kesesuaian antar sesama sampel positif, dan tentunya perbedaan dengan sampel negatif. Untuk melihat secara kasat mata ekspresi protein yang dimunculkan di *membrane*, digunakan TMB (Tetramethylbenzidine) Substrat sebanyak 1 ml.

3.5.6 Analisis Data

Analisis data dalam penelitian ini dilakukan secara kualitatif dengan menekankan pada interpretasi hasil visualisasi dan konfirmasi ekspresi protein. Data kualitatif yang diperoleh dari metode *Immunofluorescence Assay* diamati dengan beberapa aspek yaitu keberadaan sinyal merah, distribusi sinyal, dan perbandingan dengan sampel negatif. Donaldson, (2015) menyatakan bahwa keberadaan sinyal menjadi aspek yang utama dalam interpretasi hasil IF Assay karena ini merupakan penanda adanya reaksi antara antigen dan antibodi. Selain itu terdapat lokalisasi sinyal protein PCV3, menurut Mou *et al.*, (2019) lokalisasi sinyal

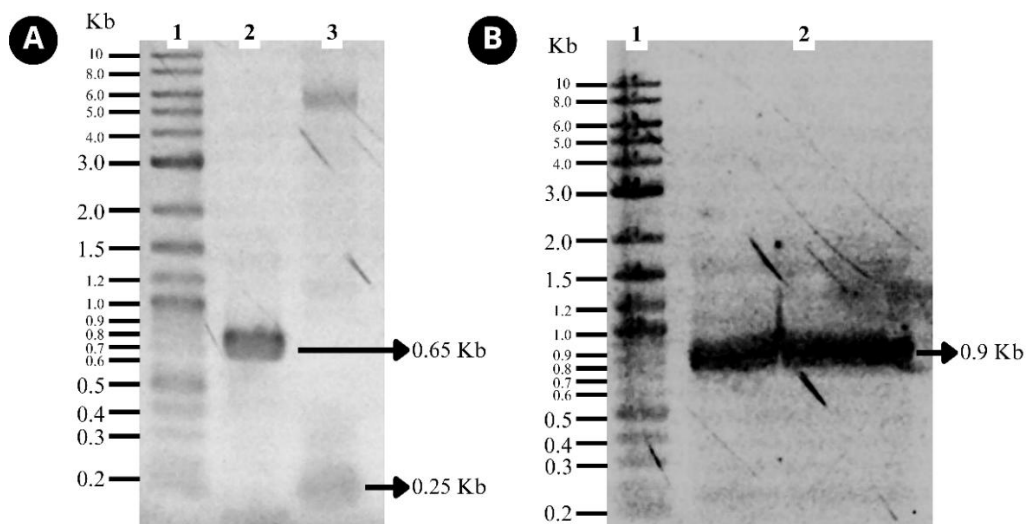
PCV3 ini terdapat di sitoplasma sel. Kemudian hasil pengamatan juga dibandingkan dengan sampel negatif yang tidak ada sinyal reaksi antigen dan antibodi (Buchwalow, 2010).

Data yang diperoleh dari metode Western Blot dianalisis secara kualitatif berdasarkan keberadaan pita (berat molekul) dan kejernihan pada semua sampel dan kondisi (Lugos *et al.*, 2025). Selain itu, keberadaan semua protein yang terdeteksi melalui SDS-Page diamati dan dibandingkan dengan hasil blotting antibodi. Hasil kemudian dibandingkan dengan hasil deteksi berat molekul yang telah dipublikasikan sebelumnya yaitu 26 kDa (S. Zhang *et al.*, 2019) hingga 27 kDa (Podgornik, 2013).

BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Konstruksi Genetik Protein Kapsid Virus PCV3

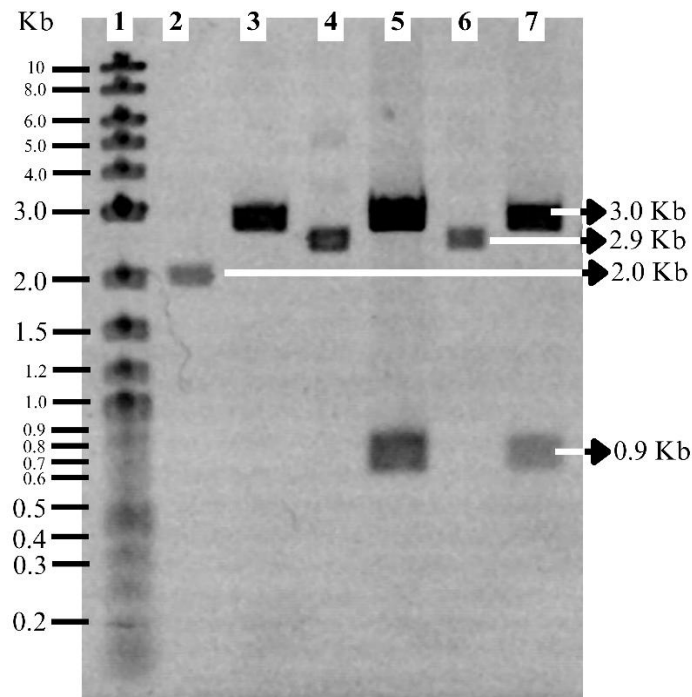
Fragmen genetik PCV3 yang mengkode protein kapsid pada penelitian ini berhasil dikonstruksi dan diamplifikasi pada ukuran yang sesuai yaitu 0,9 Kb. Ukuran tersebut didapatkan dari hasil *overlapping PCR* dua *template* genetik yaitu pVAX1.PCV3 dan EVCVAm3-His dengan panjang 0,65 Kb dan 0,25 Kb (Gambar 4.1.1). Kedua fragmen ini merupakan sekuen gen target yang digunakan untuk konstruksi gen rekombinan. Ukuran 0,9 Kb ini sesuai dengan hasil penelitian sebelumnya yang menggunakan konstruksi gen PCV3 serupa (Polyiam *et al.*, 2021), maka dari itu ukuran 0,9 Kb pada penelitian ini dijadikan acuan dalam seluruh tahap pengujian selanjutnya yang menggunakan teknik molekuler amplifikasi dan elektroforesis. Hasil elektroforesis untuk *template* genetik pVAX1.PCV3 dan pVAX1.EVCVAm3-His serta gabungan (*Overlapp*) antar keduanya ditunjukkan pada gambar berikut ini:



Gambar 4.1.1 Konstruksi genetik. Keterangan: (A) Hasil amplifikasi *template* genetik. *Lane* 1, marker Log-2 DNA; *Lane* 2, DNA PCV3 yaitu 0,65 Kb; *Lane* 3, DNA His-Tag yaitu 0,25 Kb. (B) Hasil Penggabungan (*Overlapp*) antara 2 *Template* DNA. *Lane* 1, marker Log-2 DNA; *Lane* 2, pita DNA rekombinan yaitu 0,9 Kb.

Fragmen rekombinan selanjutnya dikloning ke dalam *Escherichia coli* DH5 α untuk memperbanyak plasmid dan dilakukan *screening* menggunakan *Rapid Size Assay*. Sebanyak 40 koloni didapatkan dari hasil *Screening*, 6 diantaranya memiliki pita DNA berukuran 0,9 Kb dengan nomor 2, 5, 13, 25, 37, dan 38 (Lampiran 2). Dari hasil tersebut dipilih sampel nomor 2 dan 38 karena memiliki visualisasi garis DNA nya yang bebas dari kontaminasi RNA (Lampiran 2). Selain itu, pada saat pengecekan konsentrasi DNA, didapatkan hasil konsentrasi DNA yaitu 431,7 ng/ μ l untuk sampel nomor 2 dan 495,8 ng/ μ l untuk sampel nomor 38. Menurut Wulan dkk., (2021) angka ini menunjukkan kadar DNA yang tinggi sehingga tepat untuk pengujian imunogenisitas. Maka dari itu, kedua koloni tersebut merupakan koloni yang dipilih untuk dilanjutkan ke tahap berikutnya.

Validasi akhir dilakukan menggunakan *enzyme digest assay* untuk memastikan keberadaan dan posisi insert dalam plasmid. Hasil menunjukkan perbedaan pola pita yang jelas antara sampel *cut* dan *uncut*. Pada kondisi *uncut*, baik sampel negatif maupun sampel menunjukkan pita tunggal dengan ukuran 2 dan 2,9 Kb yang merupakan bentuk *supercoiled plasmid* sehingga bermigrasi lebih cepat dibandingkan bentuk linear (Scovell, 2025). Sebaliknya, pada kondisi *cut* sampel negatif hanya menghasilkan satu pita sekitar 3 Kb yang merepresentasikan vektor tanpa insert, sedangkan sampel nomor 2 dan 38 menghasilkan dua pita yaitu 3 Kb dan 0,9 Kb. Pita 3 Kb menunjukkan panjang vektor pVAX1, sedangkan pita 0,9 Kb merupakan fragmen insert hasil konstruksi. Hasil pengujian *enzyme digest assay* ditunjukkan pada gambar berikut ini:



Gambar 4.1.2. Validasi konstruksi menggunakan metode *Enzyme Digest Assay*. Keterangan: *Lane 1*, marker Log-2 DNA; *Lane 2*, Sampel negatif (*uncut*) dengan panjang DNA 2 kb; *Lane 3*, Sampel negatif (*cut*) dengan panjang DNA 3 kb; *Lane 4*, sampel nomor 2 (*uncut*) dengan panjang DNA 2,9 Kb; *Lane 5*, Sampel nomor 2 (*cut*) dengan panjang DNA 3 kb (vektor) dan 0,9 Kb (insert); *Lane 6*, sampel nomor 38 (*uncut*) dengan panjang DNA 2,9 Kb; *Lane 7*, Sampel nomor 38 (*cut*) dengan panjang DNA 3 kb (vektor) dan 0,9 Kb (insert).

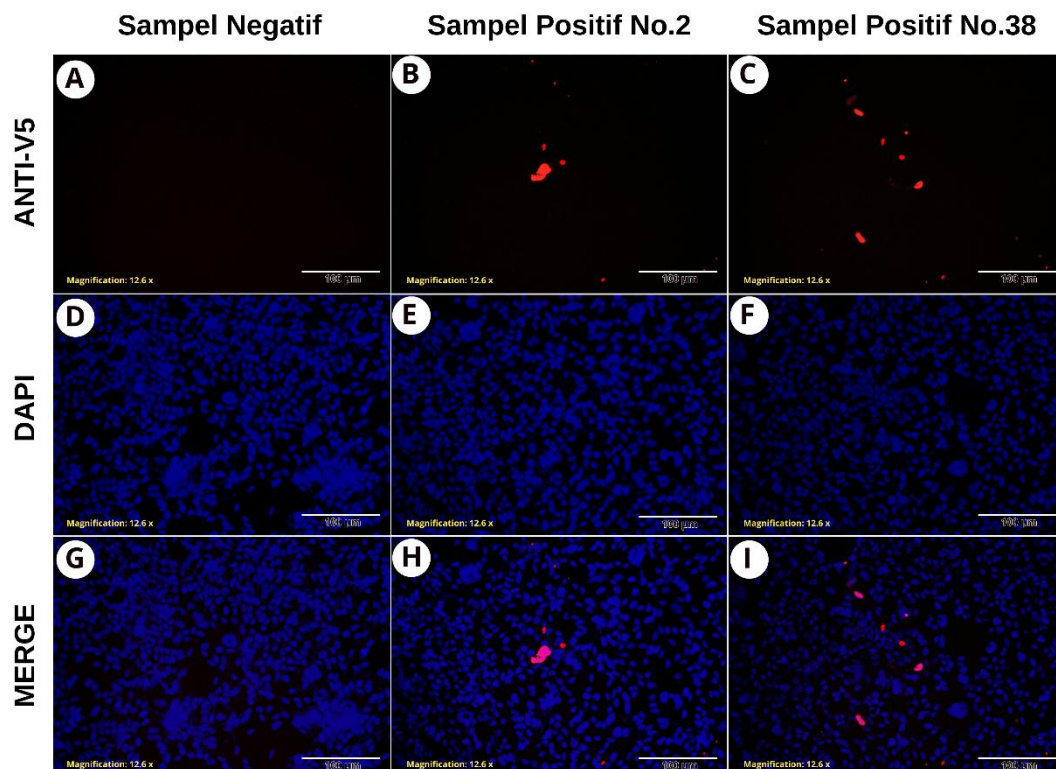
Jika dibandingkan dengan sampel negatif (*Lane 2 & 3*) terlihat perbedaan pola pita yang jelas antara plasmid tanpa *insert* dan plasmid rekombinan. Pada sampel negatif yang telah dipotong enzim restriksi, hanya muncul satu pita linear sekitar 3,0 kb yang merepresentasikan vektor tanpa sisipan gen. Tidak adanya fragmen tambahan menunjukkan bahwa plasmid tersebut memang tidak mengandung *insert*. Sebaliknya, pada Sampel 2 dan Sampel 38 yang telah dilakukan pemotongan, muncul dua pita yang konsisten yaitu 3,0 kb (*vector*) dan 0,9 kb (*insert gene*). Keberadaan fragmen 0,9 kb inilah yang menjadi pembeda utama terhadap sampel negatif. Ukuran fragmen tersebut sesuai dengan panjang gen target yang dirancang dan dapat disimpulkan bahwa Sampel 2 dan Sampel 38

mengandung konstruksi plasmid rekombinan yang berhasil. Dengan demikian, perbedaan pola pita antara sampel *cut* dan *uncut* serta munculnya fragmen 0,9 Kb pada sampel yang dipotong menjadi bukti kuat bahwa konstruksi plasmid pVAX1 yang membawa gen target PCV3 telah berhasil dilakukan dan siap digunakan pada tahap ekspresi protein selanjutnya.

Tahapan konstruksi genetik yang telah dilakukan secara keseluruhan menunjukkan bahwa gen yang ditargetkan berhasil dibuat dan dapat dilanjutkan ke tahap berikutnya. Keberhasilan konstruksi gen dalam penelitian ini menjadi tahap yang penting karena menentukan validitas seluruh rangkaian eksperimen selanjutnya. Plasmid rekombinan yang telah terverifikasi memastikan bahwa gen target benar-benar terinsersi secara spesifik dan berada dalam kerangka baca yang sesuai untuk diekspresikan (Gaffar *et al.*, 2025). Dalam konteks pengembangan protein rekombinan sebagai kandidat vaksin, ketepatan desain genetik secara langsung berpengaruh terhadap struktur protein yang dihasilkan, stabilitasnya, serta kemampuannya mempertahankan epitop imunogenik (Guler & Imamoglu, 2023).

4.2 Ekspresi Protein Kapsid dari *Porcine Circovirus 3* (PCV3) pada sel *Human Embryonic Kidney 293A* (HEK293A)

Protein kapsid yang dikode oleh gen ORF2 virus PCV3 pada penelitian ini dapat diekspresikan pada sistem inang HEK293A. Hal ini ditandai dengan hasil *Immunofluorescence Assay* yang menunjukkan adanya sinyal berwarna merah yang terdeteksi pada sampel positif yang berada di sitoplasma sel (Gambar 4.2; sampel nomor 2 & 38). Hasil IF *Assay* untuk sampel positif juga divalidasi dengan ketiadaan sinyal fluorescence pada sampel negatif (Gambar 4.2).



Gambar 4.2. Ekspresi intraseluler protein kapsid pada sel HEK293A menggunakan *immunofluorescence assay*. Keterangan: (A) Sampel negatif diberi antibodi Anti-V5 tidak mengekspresikan protein kapsid; (B) Sampel positif Nomor 2 diberi antibodi Anti-V5 mengekspresikan protein kapsid; (C) Sampel positif Nomor 38 diberi antibodi Anti-V5 mengekspresikan protein; (D) Sampel Negatif yang diberi pewarna DAPI selnya masih aktif; (E) Sampel Positif Nomor 2 yang diberi pewarna DAPI selnya masih aktif; (F) Sampel Positif Nomor 38 yang diberi pewarna DAPI selnya masih aktif; (G) Gabungan dua gambar dari sampel negatif yang menunjukkan aktivitas ekspresi berlokasi di sitoplasma; (H) Gabungan dua gambar dari sampel positif nomor 2 yang menunjukkan aktivitas ekspresi berlokasi di sitoplasma; (I) Gabungan dua gambar dari sampel positif nomor 38 yang menunjukkan aktivitas ekspresi berlokasi di sitoplasma.

Hasil pengujian *Immunofluorescence* ini selaras dengan penelitian sebelumnya yang menyatakan bahwa keberhasilan ekspresi protein rekombinan pada sel eukariotik dapat dikonfirmasi melalui munculnya sinyal fluoresen spesifik pada IF Assay. Dalam studi sebelumnya, keberadaan sinyal fluoresen berwarna merah menjadi indikator utama bahwa protein target telah diekspresikan secara efektif dan terdeteksi oleh antibodi (Yao *et al.*, 2021). Sejalan dengan itu, Song *et*

al., (2021) menyatakan bahwa protein target yang telah diikat oleh antibodi sekunder Alexa Fluorosay akan memancarkan warna merah ketika dipapar cahaya hijau 540-560 nm. Dengan demikian maka kemunculan sinyal merah pada pengujian ini menandakan bahwa protein kapsid PCV3 berhasil diekspresikan dalam sel HEK293A.

Analisis lebih lanjut terhadap distribusi sinyal menunjukkan bahwa protein kapsid PCV3 terekspresi secara spesifik di area sitoplasma sel HEK293A (Lampiran 4). Lokalisasi protein ini menurut Mou *et al.*, (2019) sesuai dengan karakteristik virus PCV3 yaitu pada proses sintesis protein, protein kapsid umumnya terdistribusi di sitoplasma. Hal ini menunjukkan bahwa protein rekombinan yang dihasilkan dapat diproses dan ditransportasikan ke bagian sel yang tepat sehingga menyerupai perilaku protein virus aslinya (Song *et al.*, 2021).

Hasil ekspresi ini kemudian diperkuat dengan perbandingan terhadap sampel negatif. Pada sampel negatif ini tidak ditemukan adanya sinyal fluoresensi berwarna merah sama sekali. Ketiadaan sinyal pada sampel negatif ini penting untuk memastikan bahwa pendaran pada sampel uji bukan disebabkan oleh *autofluorescence* sel maupun ikatan non-spesifik. Hal ini sesuai dengan prinsip yang dijelaskan oleh Buchwalow (2010) bahwa ketiadaan reaksi pada sampel negatif sebagai kontrol dapat memverifikasi spesifisitas sistem deteksi yang digunakan, sehingga dapat disimpulkan bahwa sinyal positif pada perlakuan murni berasal dari ekspresi protein kapsid PCV3.

Ekspresi protein kapsid pada sampel positif nomor 2 dan 38 memiliki perbedaan yang dapat dilihat pada beberapa sisi. Pada sampel positif nomor 2, sel yang dapat mengekspresikan protein relatif lebih rendah dibandingkan sampel

nomor 38. Hal ini dapat dilihat dari intensitas fluoresensi dari sel sampel nomor 38 yang berpendar lebih banyak dibandingkan sampel nomor 2. dikarenakan terdapat perbedaan konsentrasi plasmid yang diinsersikan ke dalam sel HEK293A. Konsentrasi plasmid yang didapatkan pada sampel nomor 2 yaitu 431,7 ng/ μ L dan pada sampel nomor 38 yaitu 495,8 ng/ μ L (Lampiran 3). Perbedaan konsentrasi plasmid menurut Moore *et al.*, (2019) berpengaruh pada hasil pengujian IF Assay, maka dari itu pada penelitian ini sampel nomor 38 memiliki sel dengan pendaran warna merah (fluoresensi) yang lebih banyak dibandingkan sampel nomor 2. Moore *et al.*, (2019) juga menyatakan bahwa kadar plasmid yang terdapat dalam sampel berbanding lurus dengan ekspresi protein dari sampel tersebut.

Keberhasilan ekspresi protein yang telah disebutkan sebelumnya merupakan suatu fenomena yang dapat dijelaskan secara ilmiah. Munculnya sinyal fluoresen berwarna merah pada pengujian *Immunofluorescence* adalah hasil dari interaksi spesifik antara antibodi sekunder yang terkonjugasi fluorofofor dengan antibodi primer yang telah berikatan dengan protein target (Joshi & Yu, 2017). Dalam penelitian ini, antibodi primer anti-V5 mengenali epitope V5-tag yang melekat pada protein kapsid PCV3, kemudian antibodi sekunder berfluorofofor akan berikatan dan memancarkan sinyal merah ketika tereksitasi pada panjang gelombang sekitar 540-560 nm. Intensitas sinyal fluoresen yang diamati mencerminkan jumlah relatif protein yang diekspresikan dalam sel. Secara teori, semakin kuat sinyal yang dihasilkan maka semakin tinggi tingkat ekspresi protein tersebut (Moore *et al.*, 2019).

Hasil sinyal fluoresen dari pengujian *Immunofluorescence* yang terlokalisasi di sitoplasma juga mencerminkan jalur ekspresi protein eukariotik yang umum

terjadi, di mana sintesis protein berlangsung pada ribosom bebas atau yang terikat pada retikulum endoplasma. Protein kapsid yang telah disintesis ini tentunya berada di sitoplasma sebelum akhirnya beralih dan masuk ke dalam nukleus (Maity *et al.*, 2023). Pranoto *et al.*, (2023) dalam pengujiannya menggunakan metode IF Assay menyatakan bahwa virus PCV3 secara dominan banyak bereplikasi di sitoplasma, walaupun beberapa ada yang bereplikasi di nukleus. Maka dari itu, lokalisasi protein kapsid PCV3 pada sitoplasma menjadi indikator penting dalam keberhasilan pengujian ekspresi protein dengan metode *Immunofluorescence Assay*.

Hasil akhir yang didapatkan dari pengujian ekspresi protein menggunakan IF Assay ini adalah sampel nomor 38 merupakan sampel dengan kualitas yang unggul dibandingkan sampel nomor 2. Hal ini dibuktikan dengan tingginya intensitas sinyal fluoresensi (merah) yang terpendar dari sel HEK293A dan kadar plasmid yang terdapat dalam sampel nomor 38. Kesimpulan akhir yang dapat diambil yaitu bahwa sampel nomor 38 merupakan sampel yang dapat dijadikan kandidat sebagai bahan produksi vaksin subunit dan bahan untuk pengujian selanjutnya yaitu pengujian secara *in vivo* pada hewan coba. Hal ini dikarenakan dalam proses produksi vaksin subunit dibutuhkan protein yang dapat dipanen dalam jumlah banyak (Apostolopoulos & Chavda, 2024).

Proses penelitian mengenai pengembangan vaksin berbasis protein rekombinan ini merupakan suatu nilai ilmiah yang dapat diambil pelajaran dibalik fenomena-fenomena yang terjadi. Protein kapsid yang dikode oleh genom ORF2 virus PCV3 merupakan suatu molekul yang tidak akan tercipta apabila tidak ada inang yang memfasilitasi ekspresinya. Dalam penelitian ini, salah satu inang yang dimaksud adalah sel HEK293A. Pada sel HEK293A, proses dimulai di dalam

nukleus, di mana DNA/genom disalin menjadi mRNA yang kemudian keluar menuju sitoplasma. mRNA tersebut akan menempel pada ribosom, baik yang berada bebas di sitoplasma maupun yang melekat pada Retikulum Endoplasma Kasar (REK) untuk menjalani proses translasi menjadi rantai polipeptida. Setelah polipeptida terbentuk di REK, protein tersebut akan dibungkus dalam vesikel transpor dan dikirim ke Badan Golgi untuk menjalani modifikasi lanjutan dan pengemasan akhir. Selain itu, organel seperti mitokondria turut berperan penting dalam menyediakan energi (ATP) yang dibutuhkan di setiap tahapan proses ini agar berjalan dengan lancar (Alhalimi *et al.*, 2020).

Rangkaian proses sintesis protein tersebut merupakan salah satu kuasa Allah dalam mengatur kehidupan bahkan pada tingkat seluler dan molekuler secara tepat dan seimbang. Hal ini sesuai dengan Firman Allah *Subhanahu Wa ta'ala* dalam surah Al-Qamar ayat 49 yaitu:

إِنَّا كُلَّ شَيْءٍ خَلَقْنَاهُ بِقَدَرٍ

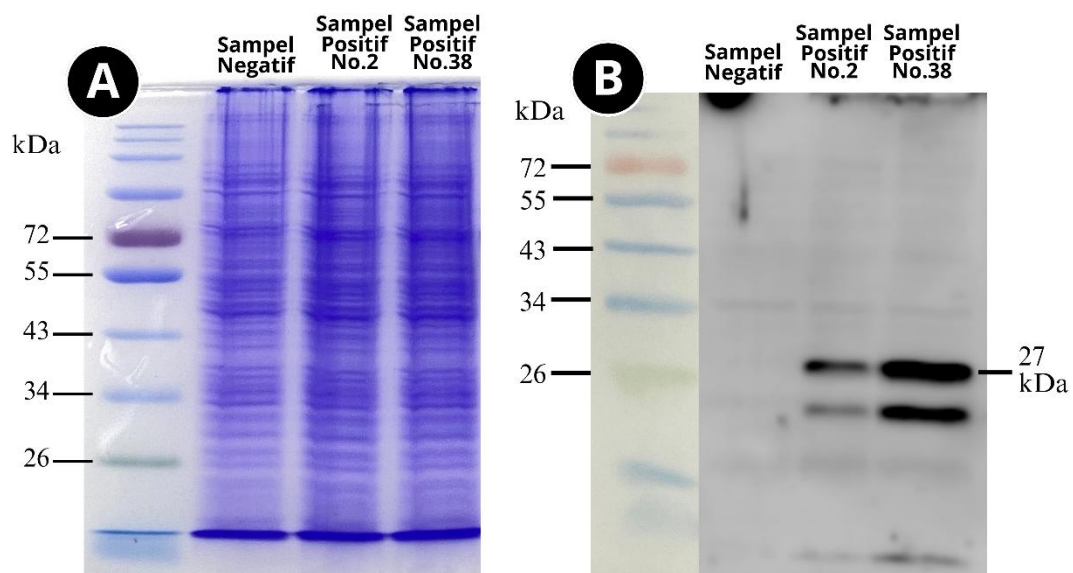
Artinya: “*Sungguh, Kami menciptakan segala sesuatu menurut ukuran*”

Kementrian Agama RI (2015) dalam Tafsir Wajiz menjelaskan bahwa maksud ayat tersebut yaitu Allah telah menetapkan dan menentukan suatu sistem dari apa yang diciptakan-Nya. Shihab (2002) dalam tafsirnya Al-Misbah menyatakan bahwa Tidak ada satu pun yang Allah ciptakan sia-sia atau tanpa tujuan yang benar dan semuanya diberi potensi yang sesuai dan dengan kadar yang cukup untuk melaksanakan fungsinya, dan semuanya kait berkait, tunjang menunjang dalam satu keseimbangan. Al-Naggar (2007) dalam kitabnya *tafsirul Ayatil Kauniyah Fil Qur'anil Kariim* menjelaskan bahwa ayat ini juga bermaksud membahas mengenai aktivitas sel yang sejatinya dilakukan oleh unit-unit di dalam

sel bernama organel. Beliau juga menjelaskan bahwa Allah *Subhanahu Wa Ta'ala* memberikan kemampuan kepada organel bernama ribosom untuk memproduksi ratusan ribu jenis protein yang dibutuhkan oleh sel hidup dan mensekresikannya sesuai dengan intruksi yang diberikan oleh nukleus sel. Kemudian terdapat pula organel bernama mitokondria yang menjadi tempat bahan organik diubah menjadi energi yang dibutuhkan untuk berbagai macam aktivitas sel.

4.3 Ekspresi Protein Kapsid dari *Porcine Circovirus 3* (PCV3) pada *Escherichia coli* BL21

Protein kapsid yang dikode oleh gen ORF2 virus PCV3 pada penelitian ini berhasil diekspresikan pada sistem inang *Escherichia coli* BL21. Hal ini ditandai dengan hasil pengujian *Western Blot* yang menunjukkan adanya protein yang terdeteksi memiliki berat molekul 27 kDa (Gambar 4.3.B). Hasil *Western Blot* untuk sampel positif juga divalidasi dengan ketiadaan protein pada sampel negatif (Gambar 4.3.B).



Gambar 4.3. Pengujian *western blot* pada sampel protein dari *E.Coli* BL21. Keterangan: (A) Hasil SDS-Page seluruh protein; dan (B) Berat molekul protein kapsid yang terdeteksi yaitu 27 kDa.

Hasil pengujian ekspresi protein dengan metode SDS-Page menunjukkan bahwa seluruh protein dapat terseparasi berdasarkan berat molekulnya (Gambar 4.3.A). Keseluruhan protein yang didapatkan ini belum diketahui protein targetnya (protein kapsid). Oleh karena itu, dilakukan pengikatan protein spesifik (*Immunoblotting*) agar didapatkan protein dengan berat molekul yang sesuai dengan prediksi yang didasarkan pada penelitian sebelumnya yaitu antara 26 kDa (S. Zhang *et al.*, 2019) hingga 27 kDa (Podgornik, 2013).

Uji spesifitas yang digunakan yaitu dengan *Western Blot*. Hasil western blot yang didapatkan yaitu terbentuk *band* dengan berat molekul 27 kDa pada sampel positif nomor 2 dan 38. *Band* 27 kDa ini merupakan berat molekul protein kapsid yang terbentuk karena ada reaksi spesifik antara antigen V5 dengan antibodi anti-V5. Prosesnya diawali dengan ikatan antara antigen dengan antibodi primer, kemudian antibodi primer berikatan dengan antibodi sekunder yang telah dilabeli dengan enzim alkaline fosfatase. Enzim inilah yang akan bereaksi dengan protein dan memunculkan warna biru gelap keunguan yang dapat ditransfer ke membran nitroseluler yang akhirnya dapat diamati (Hidayat & Wulandari, 2021).

Protein yang terikat pada sampel positif nomor 2 dan 38 masing-masing memiliki perbedaan ketebalan *band*. Pada sampel nomor 38, *band* yang terbentuk memiliki karakteristik yang lebih tebal dibandingkan dengan *band* pada nomor 2. Perbedaan ketebalan ini dapat disebabkan jumlah protein pada kedua sampel yang berbeda dan kuantitas plasmid yang diinokulasikan ke bakteri *E.coli* BL21 yang berbeda pula. Perbedaan ini selaras dengan hasil pengujian sebelumnya yaitu pada pengujian *Immunofluorescence* yang menunjukkan bahwa sampel nomor 38 lebih unggul dibandingkan sampel nomor 2.

Hasil ekspresi protein dengan metode *Western Blot* ini menunjukkan bahwa protein kapsid dari virus PCV3 yang telah dilabeli dengan epitop tag V5 dapat terikat dengan antibodi yang spesifik. Hasil ini dapat menjadi dasar bahwa proses dan prosedur pada penelitian tahap ini dapat dijadikan sebagai model untuk pengembangan vaksin berbasis protein rekombinan. Selain itu, Butkhot *et al.*, (2025) dalam penelitiannya menjelaskan bahwa sampel yang telah terkonfirmasi ekspresi proteinnya melalui metode *western blot* dapat dilanjutkan ke tahap uji ELISA dan berlanjut ke tahap pengujian secara *in vivo* pada hewan coba.

Pengujian pada tahap *in vivo* dilakukan guna mengetahui secara langsung bagaimana respon tubuh inang terhadap subunit vaksin. Pada konteks PCV3, riset terkait subunit vaksin ini bertujuan sebagai model untuk pengembangan subunit vaksin lain yang berpotensi menyerang manusia karena hingga saat ini metode paling efektif yang digunakan untuk penanganan virus yaitu dengan vaksinasi. Dengan ini maka pengembangan vaksin merupakan suatu upaya untuk mengobati atau mencegah infeksi virus yang dapat menyerang tubuh dengan memanfaatkan bagian dari virus itu sendiri. Prinsip ini sejalan dengan hadits nabi yang diriwayatkan oleh Imam Bukhari yaitu:

حَدَّثَنَا مُحَمَّدُ بْنُ الْمُثَنَّى حَدَّثَنَا أَبُو أَحْمَدَ الزُّبَيْرِيُّ حَدَّثَنَا عُمَرُ بْنُ سَعِيدٍ بْنُ أَبِي حُسَيْنٍ
قَالَ حَدَّثَنِي عَطَاءُ بْنُ أَبِي رَبَاحٍ عَنْ أَبِي هُرَيْرَةَ رَضِيَ اللَّهُ عَنْهُ عَنِ النَّبِيِّ صَلَّى اللَّهُ عَلَيْهِ
وَسَلَّمَ قَالَ مَا أَنْزَلَ اللَّهُ دَاءً إِلَّا أَنْزَلَ لَهُ شِفَاءً

Artinya: “Muhammad bin Al-Mutsanna telah memberitahukan kepada kami, ia berkata, Abu Ahmad Az-Zubairi telah memberitahukan kepada kami, ia berkata, Umar bin Said bin Abu Husain telah memberitahukan kepada kami, ia mengatakan, Atha bin Abi Rabah telah memberitahukan kepada kami, dari Abu Hurairah Radhiyallahu Anhu dari Nabi Shallallahu Alaihi wa Sallam, beliau bersabda, "Tidaklah Allah menurunkan suatu penyakit kecuali menurunkan pula penyembuhnya (obat)." (HR. Al-Bukhari No. 5678)

Hadist diatas menurut Al-Utsaimin (2016) menjelaskan bahwa penyembuhan dari penyakit bisa dengan bacaan Al-Qur'an, doa, ta'awwudz, dan bisa pula dengan obat-obatan. Jadi, mengobati itu ada dua cara, yang pertama yaitu dengan ta'awwudz, doa, bacaan Al-Qur'an, dan yang semisalnya. Cara kedua yaitu dengan obat-obatan alami yang telah dikenal, baik lewat wahyu, seperti, madu yang mengandung obat bagi manusia, atau dengan pengalaman-pengalaman. Dalam hadits nabi yang lain, yang diriwayatkan oleh Imam Muslim, Rasulullah *Shallallahu 'Alaihi Wa Sallam* bersabda:

An-Nawawi (2010) dalam kitab *Syarah Shahih Muslim: Al-Minhaj Syarh Ṣaḥīḥ Muslim ibn al-Ḥajjāj* menjelaskan bahwa hadits tersebut merupakan anjuran untuk berobat dan menjaga kesehatan. An-Nawawi (2010) juga menegaskan bahwa berobat tidak bertentangan dengan takdir Allah meskipun segala sesuatu terjadi menurut qadha' dan qadar-Nya. Bahkan, berobat merupakan bagian dari ikhtiar yang diperintahkan, seperti halnya berdoa, membentengi diri, dan menjauhi hal-hal yang membahayakan. Hal ini juga sesuai dengan penjelasan dari Al-Atsqalani (2010) bahwa berobat tidak menafikan sifat tawakkal sebagaimana ia tidak dinafikan oleh makan untuk menghilangkan rasa lapar dan minum untuk menghilangkan haus. Demikian juga usaha menghindari hal-hal yang membinasakan serta permohonan agar diberi keselamatan dan dihindarkan dari batraya atau selain itu.

BAB V PENUTUP

5.1 Kesimpulan

Kesimpulan pada penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Fragmen genetik PCV3 yang mengkode protein kapsid berhasil dikonstruksi yang ditandai dengan panjang fragmen berukuran 0,9 Kb.
2. Protein kapsid PCV3 terekspresi pada sel HEK293A yang ditandai dengan sinyal fluoresen berwarna merah pada *Immunofluorescence Assay*.
3. Protein kapsid PCV3 terekspresi pada sel *Escherichia coli* BL21 HEK293A yang ditandai dengan berat molekul berukuran 27 kDa pada pengujian *Western Blot*.

5.2 Saran

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan, saran yang dapat diberikan untuk penelitian selanjutnya yaitu perlu adanya optimasi pada beberapa tahapan, contohnya adalah pada tahap *enzyme digest assay* perlu dilakukan inkubasi pada semua sampel agar tidak terjadi *supercoiled* pada DNA. Pada tahap pengujian ekspresi protein perlu dilakukan penghitungan sel aktif dan penghitungan intensitas *band* pada metode *western blot*. Selain itu, perlu dilakukan uji ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) agar dapat diketahui interaksinya dengan immunoglobulin dalam penghitungan secara kuantitatif.

DAFTAR PUSTAKA

- Abaandou, L., Quan, D., & Shiloach, J. (2021). Affecting hek293 cell growth and production performance by modifying the expression of specific genes. *Cells*, 10(7), 1–21. <https://doi.org/10.3390/cells10071667>
- Abdizadeh, R., Maraghi, S., Ghadiri, A. A., Tavalla, M., & Shojaee, S. (2015). Cloning and expression of major surface antigen 1 gene of *Toxoplasma gondii* RH strain using the expression vector pVAX1 in Chinese Hamster Ovary cells. *Jundishapur Journal of Microbiology*, 8(3), 1–10.
- Alhalimi, A., Alzobaidi, N., & Abdulrahman, A. (2020). Intracellular Protein Biosynthesis : A Review. 5(2), 10–18.
- Al Asqalani, Ibnu Hajar. 2010. Fathul Baari: Penjelasan Kitab Shahih Bukhari (Fathul Baari Syarah Shahih Al Bukhari). Amiruddin (penj.). Jakarta: Pustaka Azzam.
- Al-‘Utsaimin, M. b. Ş. (2010). Syarah Şaḥīḥ al-Bukhārī (A. I. Al-Atsari, Trans.; Jilid 7). Darus Sunnah Press.
- Al-Naggar, Zaghoul. (2007). Tafsirul Ayatil Kauniyat Fil Qur’anil Kariim. Maktabah Asy-Syuruq Ad-Dauliyah, Kairo.
- An-Nawawi, I. (2010). Syarah Şaḥīḥ Muslim (Al-Minhāj Syarḥ Şaḥīḥ Muslim bin al-Ḥajjāj) (A. Ihsan Al-Atsari, Trans.; Jilid 10). Darus Sunnah Press.
- Ath-Thabari, A. J. M. bin J. (1999). Tafsīr Ath-Ṭabarī (A. Abdurrazizq al-Bakri, M. Adil Muhammad, M. Abdul Lathif Khalaf, & M. M. Abdul Hamid, Eds.). Pustaka Azzam.
- Apostolopoulos, V., & Chavda, V. P. (2024). Subunit protein-based vaccines. In *Advanced Vaccination Technologies for Infectious and Chronic Diseases*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-443-18564-9.00011-4>
- Basavaraju, M., & Gunashree, B. S. (2023). *Escherichia coli : An Overview of Main Characteristics . Escherichia Coli - Old and New Insights*.
- Begum, H., Murugesan, P., & Tangutur, A. D. (2022). Western blotting: A powerful staple in scientific and biomedical research. *BioTechniques*, 73(1), 59–69. <https://doi.org/10.2144/btn-2022-0003>
- Buchwalow, I. B. (2010). *Immunohistochemistry : Basics and Methods*. 19.
- Butkhot, N., Kaewchomphunuch, T., & Rattanaamnuychai, P. (2025). Maternal and lactogenic immunity in gestating sows induced by adenoviruses expressing mucosal immunogens derived from porcine epidemic diarrhea virus. 1–24.
- Cao, X., Huang, M., Wang, Y., Chen, Y., Yang, H., & Quan, F. (2023).

- Immunogenicity Analysis of PCV3 Recombinant Capsid Protein Virus-like Particles and Their Application in Antibodies Detection. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(12). <https://doi.org/10.3390/ijms241210377>
- Chen, D., Zhang, L., & Xu, S. (2023). Pathogenicity and immune modulation of porcine circovirus 3. *Frontiers in Veterinary Science*, 10, 1–8. <https://doi.org/10.3389/fvets.2023.1280177>
- Cho, H., Kang, I., Oh, T., Yang, S., Park, K. H., & Min, K. (2020). Comparative study of the virulence of 3 major Korean porcine circovirus type 2 genotypes (a , b , and d). 235–240.
- Chung, H., Park, Y., & Park, B. (2021). Genotyping of PCV3 based on reassembled viral gene sequences. 474–482. <https://doi.org/10.1002/vms3.374>
- Cid, R., & Bolívar, J. (2021). Platforms for Production of Protein-Based Vaccines: From Classical to Next-Generation Strategies. *Biomolecules*, 1–33.
- Dash, S., Farnós, O., Yang, Z., Sudalaiyadum Perumal, A., Chaves Fulber, J. P., Venereo-Sánchez, A., Leclerc, D., & Kamen, A. A. (2023). A rapid procedure to generate stably transfected HEK293 suspension cells for recombinant protein manufacturing: Yield improvements, bioreactor production and downstream processing. *Protein Expression and Purification*, 210(December 2022). <https://doi.org/10.1016/j.pep.2023.106295>
- Departemen Agama RI. (2016). Al-Qur'an dan Tafsirnya. Widya Cahaya, Jakarta
- Donaldson, J. G. (2015). *Immunofluorescence Staining*. December, 1–7. <https://doi.org/10.1002/0471143030.cb0403s69>
- Du, F., Liu, Y. Q., Xu, Y. S., Li, Z. J., Wang, Y. Z., Zhang, Z. X., & Sun, X. M. (2021). Regulating the T7 RNA polymerase expression in E. coli BL21 (DE3) to provide more host options for recombinant protein production. *Microbial Cell Factories*, 20(1), 1–14. <https://doi.org/10.1186/s12934-021-01680-6>
- Faravelli, S., Campioni, M., Palamini, M., Canciani, A., Chiapparino, A., & Forneris, F. (2021). Optimized recombinant production of secreted proteins using human embryonic kidney (hek293) cells grown in suspension. *Bio-Protocol*, 11(8), 1–15. <https://doi.org/10.21769/BioProtoc.3998>
- Feijoo-Siota, L., Rama, J. L. R., Sánchez-Pérez, A., & Villa, T. G. (2017). Considerations on bacterial nucleoids. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 101(14), 5591–5602. <https://doi.org/10.1007/s00253-017-8381-7>
- Fu, X., Fang, B., Ma, J., Liu, Y., Bu, D., Zhou, P., Wang, H., Jia, K., & Zhang, G. (2017). Insights into the epidemic characteristics and evolutionary history of the novel porcine circovirus type 3 in southern China. 3, 1–8. <https://doi.org/10.1111/tbed.12752>

- Gaffar, S., Imran, M., Hameed, F., Ali, A., & Fatima, B. (2025). Role Of Recombinant Plasmid Expression Study - A Review. 3(3), 648–654.
- Graham, F. L., Smiley, J., Russell, W. C., & Nairn, R. (1977). Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *Journal of General Virology*, 36(1), 59–72. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-36-1-59>
- Guler, B. A., & Imamoglu, E. (2023). Current Strategies to Improve Efficiency of Recombinant Subunit Vaccines. *Journal of Infectious Diseases and Epidemiology*, 9(3), 1–6. <https://doi.org/10.23937/2474-3658/1510299>
- Hayashi, S., Ohshima, Y., Furuya, Y., Nagao, A., Oroku, K., Tsutsumi, N., Sasakawa, C., & Sato, T. (2018). *First detection of porcine circovirus type 3 in Japan*. 1468–1472. <https://doi.org/10.1292/jvms.18-0079>
- Hidayat, R., & Wulandari, P. (2021). Western Blotting (WB) Technique Guideline for Separation and Isolation of Protein. *Bioscientia Medicina: Journal of Biomedicine & Translational Research*.
- Hnasko, T. S., & Robert, M. H. (2015). ELISA: Methods and Protocols. *Methods in Molecular Biology*, 1318, 1–216. <https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2742-5>
- Hu, J., Han, J., Li, H., Zhang, X., Liu, L. L., Chen, F., & Zeng, B. (2018). Human Embryonic Kidney 293 Cells: A Vehicle for Biopharmaceutical Manufacturing, Structural Biology, and Electrophysiology. *Cells Tissues Organs*, 205(1), 1–8. <https://doi.org/10.1159/000485501>
- Jeong, H., Kim, H. J., & Sang Jun, L. (2018). Complete genome sequence of Escherichia coli strain WG5. *Genome Announcements*, 6(2), 2015. <https://doi.org/10.1128/genomeA.01403-17>
- Jiang, H., Wei, L., Wang, D., Wang, J., Zhu, S., She, R., & Liu, T. (2020). ITRAQ-based quantitative proteomics reveals the first proteome profiles of piglets infected with porcine circovirus type 3. *Journal of Proteomics*, 212(November 2019), 103598. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2019.103598>
- Joshi, S., & Yu, D. (2017). Immunofluorescence. In *Basic Science Methods for Clinical Researchers*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803077-6.00008-4>
- Karuppannan, A. K., & Kwang, J. (2011). ORF3 of porcine circovirus 2 enhances the in vitro and in vivo spread of the virus. *Virology*, 410(1), 248–256. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2010.11.009>
- Kim, S., Park, J., Jung, J., Kim, H., Park, Y., Lee, K., Lyoo, Y. S., Yeo, S., & Park, C. (2018). Detection and genetic characterization of porcine circovirus 3 from aborted fetuses and pigs with respiratory disease in Korea Seong-Hee. 19 (5),

721–724.

- Kroeger, M., Temeeyasen, G., & Piñeyro, P. E. (2022). Five years of porcine circovirus 3: What have we learned about the clinical disease, immune pathogenesis, and diagnosis. *Virus Research*, 314(April). <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2022.198764>
- Ku, X., Chen, F., Li, P., Wang, Y., Yu, X., Fan, S., Qian, P., Wu, M., & He, Q. (2017). Identification and genetic characterization of porcine circovirus type 3 in China. *Wiley: Transboundary and Emerging Diseases*, November 2016, 1–6. <https://doi.org/10.1111/tbed.12638>
- Kurien, B. T. (2021). *Western Blotting for the Non-Expert*.
- Kwon, T., Yoo, S. J., Park, C., & Lyoo, Y. S. (2017). Prevalence of novel porcine circovirus 3 in Korean pig populations. *Veterinary Microbiology*. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2017.06.013>
- Lajnah Pentashihan Mushaf al-Qur'an. (2015). *Jasad Renik dalam perspektif Al-Qur'an dan Sains*. Kementrian Agama RI, Jakarta.
- Li, W., & He, Q. (2022). The construction and immunogenicity analyses of a recombinant pseudorabies virus with porcine circovirus type 3 capsid protein. *Veterinary Microbiology*, 264(1), 109283. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2021.109283>
- Lin, W., Chien, M., Wu, P., Lai, C., & Huang, C. (2011). *The Porcine Circovirus Type 2 Nonstructural Protein ORF3 Induces Apoptosis in Porcine Peripheral Blood Mononuclear Cells*. 148–153.
- Litovchick, L. (2019). Detection of an antigen on an immunoblot. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2019(8), 616–621. <https://doi.org/10.1101/pdb.prot098483>
- Liu, X., Shen, H., Zhang, X., Liang, T., Ban, Y., Yu, L., & Zhang, L. (2021). Porcine circovirus type 3 capsid protein induces NF - κ B activation and upregulates pro - inflammatory cytokine expression in HEK - 293T cells. *Archives of Virology*, 0123456789. <https://doi.org/10.1007/s00705-021-05104-z>
- Lozano Terol, G., Gallego-Jara, J., Sola Martínez, R. A., Martínez Vivancos, A., Cánovas Díaz, M., & de Diego Puente, T. (2021). Impact of the Expression System on Recombinant Protein Production in Escherichia coli BL21. *Frontiers in Microbiology*, 12(June), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.682001>
- Lugos, M. D., Davou, G. I., Perikala, V., Abriba, S. P., & Damulak, D. O. (2025). *Experimental evaluation of western blotting for serum cytokine analysis*.
- Madigan, Bender, Buckley, Sattley, & Stahl. (2019). *Brock Biology of*

Microorgisme Fifteenth Edition.

- Maity, H. K., Samanta, K., & Deb, R. (2023). *Revisiting Porcine Circovirus Infection : Recent Insights and Its Significance in the Piggery Sector.*
- Moore, A. M., Boudreau, L. R., Virk, S., & Lebrun, D. P. (2019). *Quantitative Immunoblotting of Cell Lines as a Standard to Validate Immunofluorescence for Quantifying Biomarker Proteins in Routine Tissue Samples.* January, 1–12. <https://doi.org/10.3791/58735>
- Mou, C., Wang, M., Pan, S., & Chen, Z. (2019). *Identification of Nuclear Localization Signals in the ORF2 Protein of Porcine Circovirus Type 3.*
- Muhammad Jamaluddin al-Qasimi. Mahasin Al-Ta'wil. Vol. 17. Dar Ihya al-Kutub alArabiyah, 1957.
- Nawagitgul, P., Harms, P. A., Morozov, I., Thacker, B. J., Sorden, S. D., Lekcharoensuk, C., & Paul, P. S. (2002). *Modified Indirect Porcine Circovirus (PCV) Type 2-Based and Recombinant Capsid Protein (ORF2) -Based Enzyme-Linked Immunosorbent Assays for Detection of Antibodies to PCV.* 9(1), 33–40. <https://doi.org/10.1128/CDLI.9.1.33>
- Neuberg, P., & Kichler, A. (2014). Recent developments in nucleic acid delivery with polyethylenimines. In *Advances in Genetics* (Vol. 88). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800148-6.00009-2>
- Niraj, L., & Tulin, A. (2007). *PARP1 Genomics: Chromatin Immunoprecipitation Approach Using Anti-PARP1 Antibody (ChIP and ChIP-seq).* 1905(page 114), 46–48. <https://doi.org/10.1007/978-1-61779-270-0>
- Palinski, R., Pablo, P., Pengcheng, S., Fangfeng, Y., Rui, G., Ying, F., Emily, B., & Ben, M. H. (2017). crossm A Novel Porcine Circovirus Distantly Related to Known Circoviruses Is Associated with Porcine Dermatitis and Nephropathy Syndrome and. *Journal of Virology*, 91(1), 1–13.
- Phan, T. G., Giannitti, F., Rossow, S., Marthaler, D., Knutson, T. P., Li, L., Deng, X., Resende, T., Vannucci, F., & Delwart, E. (2016). *Detection of a novel circovirus PCV3 in pigs with cardiac and multi-systemic inflammation.* 1–8. <https://doi.org/10.1186/s12985-016-0642-z>
- Podgornik, R. (2013). *Statistical analysis of sizes and shapes of virus capsids.* 215–228. <https://doi.org/10.1007/s10867-013-9302-3>
- Polyiam, K., Phoolcharoen, W., Butkhot, N., Srisaowakarn, C., Thitithanyanont, A., Auewarakul, Prasert Marasri, R., Phenjun, M., & Roshorm, Y. M. (2021). Immunodominant linear B cell epitopes in the spike and membrane proteins of SARS - CoV - 2 identified by immunoinformatics prediction and immunoassay. *Scientific Reports*, 1–18. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-99642-w>

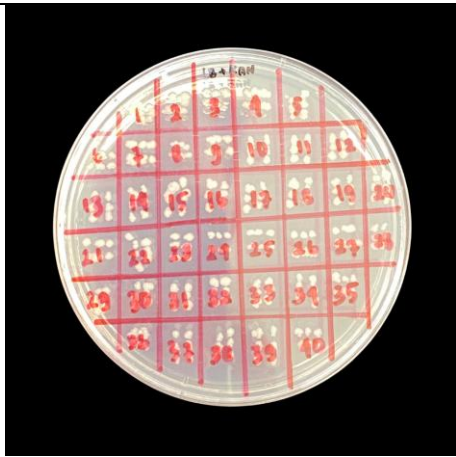
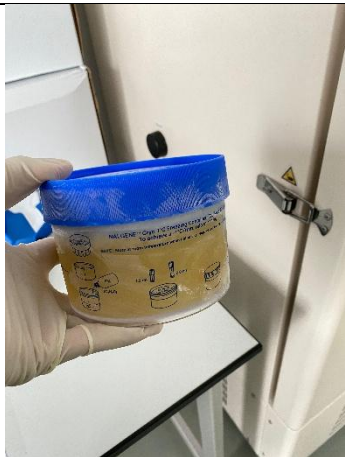
- Pranoto, S., Wu, H. C., & Chu, C. Y. (2023). Porcine Circovirus Type 3: Diagnostics, Genotyping, and Challenges in Vaccine Development. *Transboundary and Emerging Diseases*, 2023. <https://doi.org/10.1155/2023/8858447>
- Qi, S., Su, M., Guo, D., Li, C., Wei, S., Feng, L., & Sun, D. (2019). *Molecular detection and phylogenetic analysis of porcine circovirus type 3 in 21 Provinces of China during 2015 – 2017*. *October 2018*, 1004–1015. <https://doi.org/10.1111/tbed.13125>
- Rattanaamnuaychai, P., Mekvichitsaeng, P., & Poomputsa, K. (2018). Generation of a DNA vaccine expressing the porcine epidemic diarrhea virus immunogen fused with cholera toxin B subunit. *The 6th International Conference on Biochemistry and Molecular Biology*, 1–11.
- Rosario, K., Breitbart, M., Harrach, B., Segale's, J., Delwart, E., Biagini, P., & Arvind, V. (2017). Revisiting the taxonomy of the family Circoviridae: establishment of the genus Cyclovirus and removal of the genus Gyrovirus. *VIROLOGY DIVISION NEWS*, 1447–1463. <https://doi.org/10.1007/s00705-017-3247-y>
- Rosario, K., Duffy, S., & Mya, B. (2012). A field guide to eukaryotic circular single-stranded DNA viruses: insights gained from metagenomics. *Arch Virol*. <https://doi.org/10.1007/s00705-012-1391-y>
- Safitri, I. A., Sugijo, Y., Puspasari, F., Masduki, F. F., Ihsanawati, Giri-Rachman, E. A., Artarini, A. A., Tan, M. I., & Natalia, D. (2024). Immunogenicity studies of recombinant RBD SARS-CoV-2 as a COVID-19 vaccine candidate produced in *Escherichia coli*. *Vaccine: X*, 16(July 2023), 100443. <https://doi.org/10.1016/j.jvax.2024.100443>
- Scovell, W. M. (2025). Supercoiled DNA. *Concepts in Biochemistry*.
- Shihab, Q. 2002. Tafsir Al-Misbah Volume 7. Jakarta. Penerbit Lentera Hati.
- Silva, R. R. da, Silva, D. F. da, Silva, V. H. da, & Castro, A. M. M. G. d. (2023). Porcine circovirus 3: a new challenge to explore. *Frontiers in Veterinary Science*, 10(April), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fvets.2023.1266499>
- Song, J., Hou, L., Wang, D., Wei, L., Zhu, S., & Wang, J. (2021). *Nucleolar Phosphoprotein NPM1 Interacts With Porcine Circovirus Type 3 Cap Protein and Facilitates Viral Replication*. 12(May), 1–13. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.679341>
- Stadejek, T., Biernacka, K., Wozniak, A., & Miłek, D. (2017). First detection of porcine circovirus type 3 on commercial pig farms in Poland. *Wiley: Transboundary and Emerging Diseases*, March, 1–4. <https://doi.org/10.1111/tbed.12672>
- Tochetto, C., Lima, D. ., Varela, A. P. ., Loiko, M. ., Paim, W. ., Mayer, C. M.,

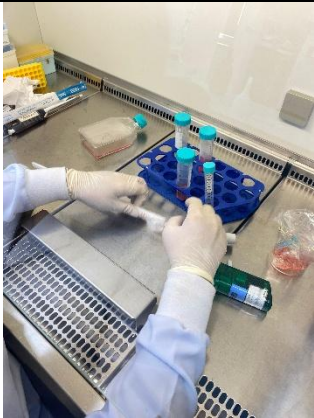
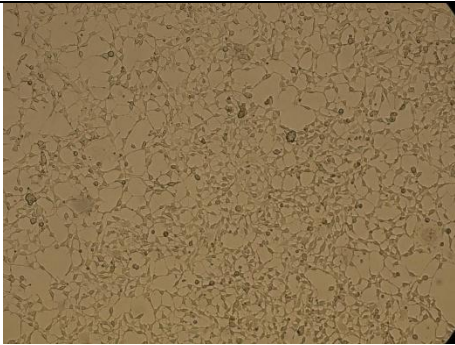
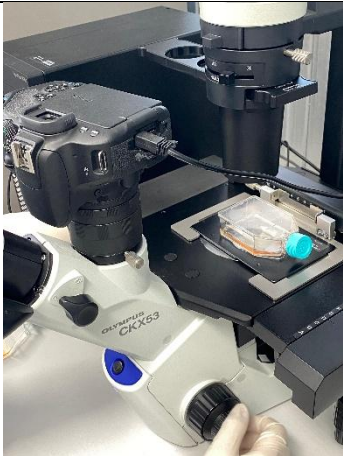
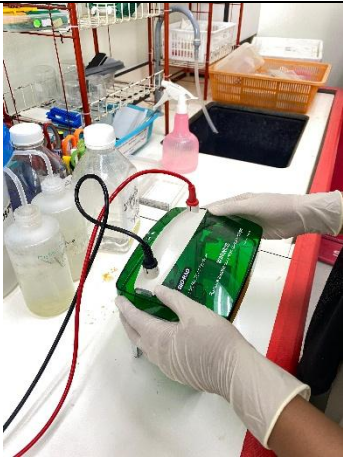
- Scheffer, J. I., Herpich, C., Cerva, C., Schmitd, S. P., Cibulski, A. C., Santos, F. Q., & Roehel, P. M. (2017). Full-Genome Sequence of Porcine Circovirus type 3 recovered from serum of sows with stillbirths in Brazil. *Wiley: Transboundary and Emerging Diseases*, August, 1–5. <https://doi.org/10.1111/tbed.12735>
- Tüting, T., Austyn, J., Storkus, W. J., & Falo, L. D. (2003). The Immunology of DNA Vaccines. *DNA Vaccines*, 29(6), 37–64. <https://doi.org/10.1385/1-59259-688-6:37>
- Wang, F., Yang, G., Song, H., Xiong, L., Wang, L., & Shen, X. (2022). The guideline for western blotting assay. *Food Frontiers*, 3(2), 347–349. <https://doi.org/10.1002/fft2.151>
- Wang, Q., Zhang, R., Wang, Y., Wang, Y., Liang, L., Ma, H., Wang, H., Si, L., & Wu, X. (2024). A Subunit Vaccine Harboring the Fusion Capsid Proteins of Porcine Circovirus Types 2, 3, and 4 Induces Protective Immune Responses in a Mouse Model. *Viruses*, 16(12). <https://doi.org/10.3390/v16121964>
- Wu, X., Wang, Q., Lu, W., Wang, Y., Han, Z., Liang, L., Gao, S., Ma, H., & Luo, X. (2024). The PCV3 Cap Virus-like Particle Vaccine with the Chimeric PCV2-Neutralizing Epitope Gene Is Effective in Mice. *Veterinary Sciences*, 11(6). <https://doi.org/10.3390/vetsci11060264>
- Wulan, D. T. R. I., Sutanta, M., & Sophian, A. (2021). *Short Communication : Comparison of two commercial DNA extraction kit to obtain high quality porcine DNA*. 18(2), 69–72. <https://doi.org/10.13057/biotek/c180203>
- Xu, H., Bao, X., Hong, W., Wang, A., Wang, K., Dong, H., Hou, J., Govinden, R., Deng, B., & Chenia, H. Y. (2021). Biological Characterization and Evolution of Bacteriophage T7- Δ holin During the Serial Passage Process. *Frontiers in Microbiology*, 12(August), 1–11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.705310>
- Yao, L., Li, C., Wang, J., Cheng, Y., Ghonaim, A. H., Sun, Q., Yu, X., Niu, W., Fan, S., & He, Q. (2021). Development of an indirect immunofluorescence assay for PCV3 antibody detection based on capsid protein. *Animal Diseases*, 1(1), 1–8. <https://doi.org/10.1186/s44149-021-00015-7>
- Yuzhakov, A. G., Raev, S. A., Alekseev, K. P., Grebennikova, T. V., Verkhovsky, O. A., Zaberezhny, A. D., & Aliper, T. I. (2018). First detection and full genome sequence of porcine circovirus type 3 in Russia. *Virus Genes*, 0(0), 0. <https://doi.org/10.1007/s11262-018-1582-z>
- Zhang, M., Liu, C. C., Huang, Y., Hill, J. E., Bravo Araya, M., Ojkic, D., & Gagnon, C. A. (2022). Phylogenetic analysis of porcine circovirus 3 circulating in Canadian pigs. *Veterinary Medicine and Science*, 8(5), 1969–1974. <https://doi.org/10.1002/vms3.851>
- Zhang, S., Wang, D., Jiang, Y., Li, Z., Zou, Y., Li, M., Yu, H., Huang, K., Yang,

- Y., & Wang, N. (2019). Development and application of a baculovirus-expressed capsid protein-based indirect ELISA for detection of porcine circovirus 3 IgG antibodies. *BMC Veterinary Research*, 15(1), 11–14. <https://doi.org/10.1186/s12917-019-1810-3>
- Zou, Y., Zhang, N., Zhang, J., Zhang, S., Jiang, Y., Wang, D., & Tan, Q. (2018). Molecular detection and sequence analysis of porcine circovirus type 3 in sow sera from farms with prolonged histories of reproductive problems in Hunan , China. *Archives of Virology*, 0123456789. <https://doi.org/10.1007/s00705-018-3914-7>

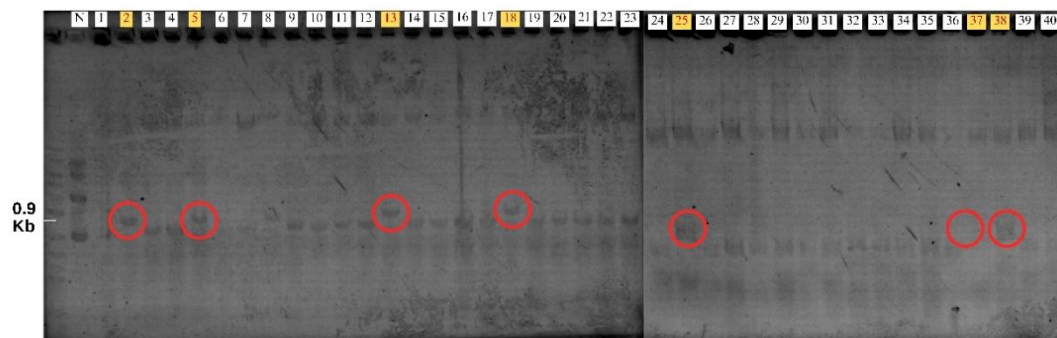
LAMPIRAN-LAMPIRAN

Lampiran 1. Dokumentasi Penelitian

1		Proses konstruksi genetik PCV3
2		Proses penanaman bakteri dengan sistem grid/kisi
3		Proses pengambilan sel HEK293A dari nitrogen cair (kriopreservasi)

4		Proses penanaman sel HEK293A
5		Gambaran Konfluensi sel HEK293A
6		Proses pengamatan dengan metode <i>immunofluorescence staining assay</i>
7		Proses SDS-Page dan western blot

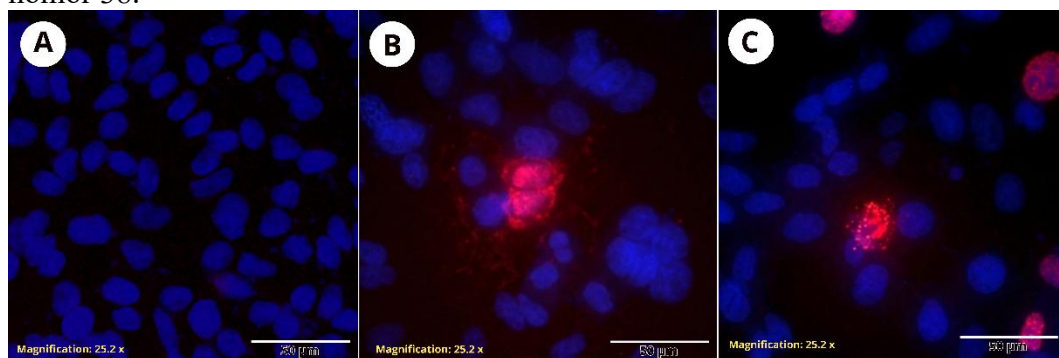
Lampiran 2. Hasil *Sreening Rapid Size Assay* yang menunjukkan sampel positif 7 koloni



Lampiran 3. Hasil Pengecekan Konsentrasi plasmid/DNA sampel positif

No.	Sampel	Konsentrasi
1	Koloni 2	431,7 ng/ μ L
2	Koloni 5	274,9 ng/ μ L
3	Koloni 13	289,4 ng/ μ L
4	Koloni 18	305,4 ng/ μ L
5	Koloni 25	510,5 ng/ μ L
6	Koloni 37	122,3 ng/ μ L
7	Koloni 38	495,8 ng/ μ L

Lampiran 4. Hasil Immunofluorescence Staining Assay dengan perbesaran lensa 25,2x. (A) Sampel sel negatif (tanpa plasmid), (B) Sampel nomor 2, (C) Sampel nomor 38.



Lampiran 6. Desain primer untuk amplifikasi *Template DNA* pVAX1.PCV3 dan pVAX1.EVCVame3-His

New- 5'Flanking	5' ATTCCTGCAGGAAGCTTTTCCCCGGGGGCCACCATG3'
Stop-RE	5' TAAGCCCGGGGCGGCCGCTTATCA3'



**KEMENTERIAN AGAMA
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI MAULANA MALIK IBRAHIM MALANG**

Jalan Gajayana Nomor 50, Telepon (0341)551354, Fax. (0341) 572533
Website: <http://www.uin-malang.ac.id> Email: info@uin-malang.ac.id

JURNAL BIMBINGAN SKRIPSI/TESIS/DISERTASI

IDENTITAS MAHASISWA

NIM : 220602110031
 Nama : MUHAMMAD AZKA SHAFARA ZAIN
 Fakultas : SAINS DAN TEKNOLOGI
 Jurusan : BIOLOGI
 Dosen Pembimbing 1 : Kholifah Holil, M.Si
 Dosen Pembimbing 2 : DIDIK WAHYUDI, S.Si., M.Si
 Judul Skripsi/Tesis/Disertasi : EKSPRESI PROTEIN KAPSID DARI PORCINE CIRCOVIRUS 3 (PCV3) PADA SEL HUMAN EMBRYONIC KIDNEY 293A (HEK293A) DAN ESCHERICHIA COLI BL21(DE3)pLysS

IDENTITAS BIMBINGAN

No	Tanggal Bimbingan	Nama Pembimbing	Deskripsi Proses Bimbingan	Tahun Akademik	Status
1	07 April 2025	Kholifah Holil, M.Si	konsultasi judul dan konsep riset	Genap 2024/2025	Sudah Dikoreksi
2	29 April 2025	Kholifah Holil, M.Si	revisi lanjutan konsep riset	Genap 2024/2025	Sudah Dikoreksi
3	05 Mei 2025	Kholifah Holil, M.Si	bimbingan latar belakang	Genap 2024/2025	Sudah Dikoreksi
4	19 Mei 2025	Kholifah Holil, M.Si	bimbingan lanjutan latar belakang	Genap 2024/2025	Sudah Dikoreksi
5	20 Mei 2025	Kholifah Holil, M.Si	bimbingan bab 1	Genap 2024/2025	Sudah Dikoreksi
6	01 Juni 2025	Kholifah Holil, M.Si	bimbingan bab 1,2,3	Genap 2024/2025	Sudah Dikoreksi
7	11 Juni 2025	Kholifah Holil, M.Si	perbaikan revisi bab 2	Genap 2024/2025	Sudah Dikoreksi
8	15 Juni 2025	Kholifah Holil, M.Si	perbaikan bab 3	Genap 2024/2025	Sudah Dikoreksi
9	25 Juni 2025	Kholifah Holil, M.Si	fix bab 1,2,3	Genap 2024/2025	Sudah Dikoreksi
10	11 September 2025	Kholifah Holil, M.Si	Bimbingan kepenulisan	Ganjil 2025/2026	Sudah Dikoreksi
11	12 September 2025	Kholifah Holil, M.Si	revisi kepenulisan & koreksi	Ganjil 2025/2026	Sudah Dikoreksi
12	15 September 2025	Kholifah Holil, M.Si	ACC Seminar Proposal	Ganjil 2025/2026	Sudah Dikoreksi
13	15 September 2025	DIDIK WAHYUDI, S.Si., M.Si	Bimbingan integrasi awal & pengarahan penulisan integrasi	Ganjil 2025/2026	Sudah Dikoreksi
14	17 September 2025	DIDIK WAHYUDI, S.Si., M.Si	koreksi pengerjaan integrasi pada bab 1&2	Ganjil 2025/2026	Sudah Dikoreksi
15	22 September 2025	DIDIK WAHYUDI, S.Si., M.Si	pengarahan lanjutan integrasi	Ganjil 2025/2026	Sudah Dikoreksi
16	23 September 2025	DIDIK WAHYUDI, S.Si., M.Si	koreksi penulisan integrasi	Ganjil 2025/2026	Sudah Dikoreksi
17	12 Januari 2026	Kholifah Holil, M.Si	Bimbingan BAB 4.1	Genap 2025/2026	Sudah Dikoreksi
18	19 Januari 2026	Kholifah Holil, M.Si	Lanjutan Bimbingan BAB 4.1	Genap 2025/2026	Sudah Dikoreksi

19	02 Februari 2026	Kholifah Holil, M.Si	Perbaikan BAB 4.1	Genap 2025/2026	Sudah Dikoreksi
20	09 Februari 2026	DIDIK WAHYUDI, S.Si., M.Si	Konsultasi Integrasi Keseluruhan	Genap 2025/2026	Sudah Dikoreksi
21	16 Februari 2026	Kholifah Holil, M.Si	Perbaikan Naskah BAB 4	Genap 2025/2026	Sudah Dikoreksi
22	23 Februari 2026	DIDIK WAHYUDI, S.Si., M.Si	Konsultasi Integrasi Lanjutan	Genap 2025/2026	Sudah Dikoreksi
23	02 Maret 2026	DIDIK WAHYUDI, S.Si., M.Si	Konsultasi Integrasi BAB 4	Genap 2025/2026	Sudah Dikoreksi
24	13 April 2026	DIDIK WAHYUDI, S.Si., M.Si	Konsultasi Lanjutan Integrasi BAB 4	Genap 2025/2026	Sudah Dikoreksi
25	13 April 2026	DIDIK WAHYUDI, S.Si., M.Si	Perbaikan Abstrak Bahasa Arab (Mulakhos Al-Bahts)	Genap 2025/2026	Sudah Dikoreksi
26	14 April 2026	Kholifah Holil, M.Si	Bimbingan Bab 4.2	Genap 2025/2026	Sudah Dikoreksi
27	15 April 2026	Kholifah Holil, M.Si	Bimbingan Bab 4.3	Genap 2025/2026	Sudah Dikoreksi

Telah disetujui
Untuk mengajukan ujian Skripsi/Tesis/Desertasi

Dosen Pembimbing 2



DIDIK WAHYUDI, S.Si., M.Si

Malang, _____

Dosen Pembimbing 1



Kholifah Holil, M.Si



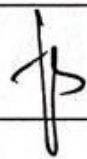


KEMENTERIAN AGAMA
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI MAULANA MALIK IBRAHIM MALANG
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI
PROGRAM STUDI BIOLOGI

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 : Muhammad Azka Shafara Zain
NIM : 220602110031
Judul : Konstruksi dan Ekspresi Protein Kapsid Porcine Circovirus 3 (PCV3) Sebagai Kandidat dalam Produksi Vaksin Subunit Secara In Vitro

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	14%	

Mengetahui,
Ketua Program Studi Biologi



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