

## Upaya Pengembangan Teknologi Cepat Transkripsi dan Translasi *In Vitro* dalam Sintesis Vaksin di Indonesia

Muhamad Ali

Laboratorium Mikrobiologi dan Bioteknologi, Fakultas Peternakan Universitas Mataram, Jl. Majapahit No. 62, Mataram  
[maliqh@yahoo.com](mailto:maliqh@yahoo.com); [ali.molbiotech@gmail.com](mailto:ali.molbiotech@gmail.com)

(Diterima 6 April 2015 – Direvisi 19 Oktober 2015 – Disetujui 23 Oktober 2015)

### ABSTRAK

Produksi protein fungsional (termasuk vaksin) menggunakan teknik konvensional dengan telur ayam berembrio memerlukan tenaga dan waktu lebih lama. Penggunaan teknik sintetik secara kimiawi dinilai tidak praktis untuk menghasilkan peptida yang berukuran lebih panjang dari 20 residu. Sebaliknya, teknologi transkripsi dan translasi *in vitro* dapat menggunakan produk *polymerase chain reaction* (PCR) secara langsung sebagai *template* untuk menghasilkan vaksin hanya dalam waktu dua jam dengan ketepatan tinggi. Teknik ini bahkan mampu menghasilkan protein 1-10 mg/ml lebih tinggi dibandingkan dengan teknik konvensional yang hanya menghasilkan satu dosis per butir telur. Pada tinjauan ini dibahas keuntungan dan kerugian produksi vaksin hewan dengan teknologi konvensional, serta transkripsi dan translasi *in vitro*. Beberapa kelebihan teknologi transkripsi dan translasi *in vitro* menyebabkan teknologi tersebut dapat dipertimbangkan sebagai metode cepat untuk skrining vaksin maupun untuk menghasilkan vaksin baru bagi hewan.

**Kata kunci:** Vaksin, transkripsi, translasi, *in vitro*

### ABSTRACT

#### Efforts to Develop Rapid Technology of *In Vitro* Transcription and Translation in Vaccine Synthesis in Indonesia

Production of functional protein (including vaccine) using conventional technology in embryonated chicken eggs is laborious and lengthy. The use of chemical synthesis is not practical for peptides longer than 20 residues. In contrast, *in vitro* transcription and translation technology can directly utilize polymerase chain reaction (PCR) product as template for vaccine synthesis within two hours accurately. Moreover, up to 1-10 mg/ml protein can be produced using the technology compared to conventional method that only gives approximately one dose per egg. In this review, advantages and disadvantages of animal vaccine generation using conventional and *in vitro* methods would be described. *In vitro* transcription and translation technology can be considered as the most practical and efficient technique for rapid screening and generating new animal vaccines.

**Key words:** Vaccine, transcription, translation, *in vitro*

### PENDAHULUAN

Sampai saat ini, vaksinasi masih diyakini sebagai cara yang paling murah dan efektif untuk mencegah serangan penyakit tertentu baik pada hewan maupun manusia. Hal ini disebabkan karena penggunaan vaksin dapat menimbulkan kekebalan aktif yang spesifik di dalam tubuh sehingga terjadinya serangan penyakit tertentu dapat ditangkal secara internal. Tindakan ini menjadi pilihan utama untuk pengobatan yang tidak hanya mahal tapi juga sering tidak efektif karena agen penyakit sudah terlanjur menginfeksi.

Lu et al. (2014) melaporkan bahwa vaksinasi merupakan cara yang paling efektif untuk menanggulangi penyakit flu burung yang sering sekali menjadi ancaman pada ternak unggas maupun manusia. Tingkat mortalitas virus H5N1 secara global pada manusia yang mencapai 75% pada tahun 2008 perlu diwaspadai. Penyakit yang dikhawatirkan merupakan

ulangan dari pandemik influenza yang terjadi pada tahun 1918 tersebut telah menelan korban hingga 50 juta orang di seluruh dunia.

Sejak Edward Jenner menemukan vaksin cacar pada tahun 1796 yang diujicobakan pada seorang pemuda pemberani bernama James Phipps, penggunaan sumber patogen yang telah dilemahkan (atenuasi) menjadi cara paling mudah untuk menghasilkan bahan yang dipergunakan sebagai vaksin. Penemuan vaksin tersebut kemudian dilanjutkan oleh Louis Pasteur yang berhasil menemukan vaksin kolera dan rabies. Zichel et al. (2010) menyatakan bahwa vaksin tradisional generasi pertama dihasilkan melalui beberapa tahapan perlakuan patogen dengan formaldehida. Penggunaan beberapa bahan kimia, seperti  $\beta$ -*propiolactine* maupun kloroform, juga dapat menghilangkan patogenitas tanpa menghilangkan sifat antigenitasnya (kemampuan untuk memicu respon kekebalan yang diinginkan). Namun, penggunaan vaksin yang diperoleh dengan

teknik tersebut mulai ditinggalkan karena kekhawatiran terhadap kemampuan patogen untuk melakukan infeksi.

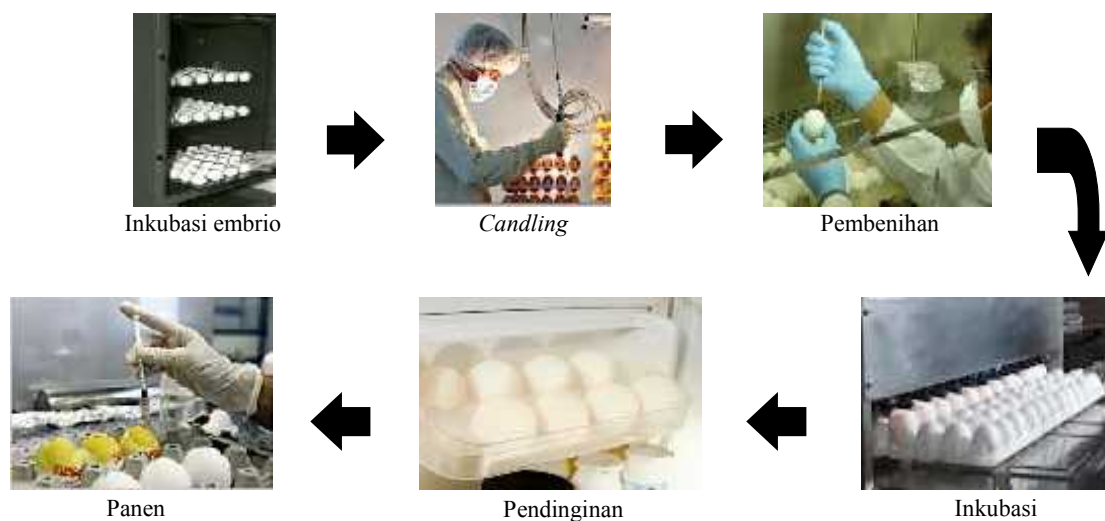
Sampai tahun 2007, semua vaksin influenza komersial dihasilkan dari telur ayam berembrio. Namun, Kasson & Pande (2008) melaporkan bahwa H1N1 yang dihasilkan pada telur ayam berembrio belum mampu merangsang kekebalan tubuh yang cukup sehingga diperlukan dosis yang lebih banyak. Selain itu, untuk menghasilkan vaksin dengan metode tersebut dibutuhkan waktu yang cukup lama, yaitu sekitar 6-8 bulan. Kondisi tersebut tentu akan menjadi hambatan terutama ketika terjadi wabah yang meluas (pandemik) (Bommakanti et al. 2010). Kasson & Pande (2008) menambahkan bahwa vaksin yang dihasilkan dari telur ayam berembrio tersebut tidak dapat diandalkan untuk mengatasi pandemik influenza yang lebih ganas seperti H5N1.

Seiring dengan kemajuan biologi molekuler, serta telah ditemukannya urutan basa (sekuen) genom dari aneka jenis patogen maka penggunaan teknologi DNA rekombinan dapat dipakai untuk menghasilkan protein fungsional yang dapat berfungsi sebagai bahan vaksin. Teknologi tersebut telah memungkinkan dihasilkannya protein tertentu dengan menggunakan gen pengkode dari patogen. Melalui kloning gen pengkode protein tertentu dari patogen yang kemudian dikombinasi dengan DNA pembawa (plasmid), maka DNA rekombinan tersebut dapat dimasukkan ke sel inang untuk menghasilkan vaksin yang diinginkan. Produk protein tertentu yang berasal dari patogen (tanpa unsur genom patogen tersebut di dalamnya) akan menghasilkan vaksin yang lebih aman daripada jenis vaksin yang dihasilkan dari patogen yang dilemahkan (Wong & Webby 2013).

## PRODUKSI VAKSIN MENGGUNAKAN TEKNOLOGI KONVENSIONAL

Produksi vaksin dengan teknologi konvensional dilakukan pada telur ayam yang memiliki embrio (*embryonated chicken egg*). Produksi vaksin dengan teknik ini terdiri dari beberapa tahap, dimulai dengan proses pembentukan embrio pada telur melalui inkubasi sampai embrio berumur 9-11 hari. Proses *culling* dilakukan terhadap telur-telur infertil melalui proses peneropongan dengan lampu (*candling*). Setelah itu, virus penyebab penyakit tertentu disuntikkan ke dalam cairan allantoik telur setelah terlebih dahulu dilakukan sterilisasi cangkang telur menggunakan 75% etanol. Proses inkubasi dilakukan selama 2-4 hari pada suhu 33-36°C kemudian di-*candling* untuk memisahkan telur yang embrionya mati. Setelah itu, telur didinginkan di kulkas untuk kemudian dilakukan panen cairan allantoik, penonaktifan secara kimiawi, serta pemisahan cairan tersebut dari protein-protein telur dengan filterisasi ataupun sentrifugasi. Proses ini diakhiri dengan uji antigenisitas vaksin dengan vaksin standar atau virus asli sebagai kontrol positif (Wong & Webby 2013). Tahapan produksi vaksin menggunakan telur ditampilkan pada Gambar 1.

Produksi vaksin dengan teknik konvensional di atas memiliki banyak kelemahan, diantaranya rendahnya kuantitas vaksin yang dihasilkan, lama waktu yang dibutuhkan, memerlukan banyak tahapan yang memerlukan tenaga dan keahlian khusus, serta peluang terjadinya kontaminasi dengan mikroorganisme lain (Wong & Webby 2013; Lu et al. 2014). Untuk menghasilkan satu dosis vaksin diperlukan 1-2 ekor butir telur ayam. Pada tahun 2002, kebutuhan dunia terhadap vaksin influenza diperkirakan mencapai 1.239



Gambar 1. Proses produksi vaksin menggunakan telur

juta dosis per tahun, sehingga diperlukan jumlah telur ayam yang sangat besar dengan pekerjaan yang cukup berat (Adu-Bobie et al. 2002). Lebih lanjut dijelaskan bahwa untuk mengatasi terjadinya pandemik, diperlukan sekitar 5-10 kali lipat dari jumlah tersebut dalam setiap tahun.

Untuk mengatasi kelemahan produksi vaksin dengan teknik di atas, maka telah dihasilkan vaksin subunit sebagai vaksin generasi kedua dengan menggunakan inang. Aneka jenis inang yang digunakan untuk menghasilkan vaksin saat ini diantaranya adalah bakteri, ragi, jamur, alga bersel satu, tanaman, sel serangga maupun sel mamalia (Valdés et al. 2003). Masing-masing inang tersebut memiliki kelebihan dan kelemahan masing-masing tergantung dari jenis dan karakteristik vaksin yang akan dihasilkan. Jika vaksin tersebut membutuhkan proses-proses modifikasi pasca-translasi, maka penggunaan sel prokariotik kurang menguntungkan. Sebaliknya, jika struktur protein vaksin lebih sederhana dan tidak memerlukan modifikasi setelah proses translasi, maka penggunaan prokariotik merupakan pilihan yang paling murah dan praktis (Sahdev et al. 2008).

Diantara inang dari jenis prokariotik, *Escherichia coli* merupakan pilihan yang paling banyak dipakai saat ini. Hal ini disebabkan beberapa alasan, diantaranya karena cepat tumbuh, memerlukan media yang murah, serta genom bakteri tersebut sudah dipelajari secara luas (Sezonov et al. 2007). Metode ini sangat populer akhir-akhir ini karena teknologinya sudah mapan, didukung oleh alat dan bahan yang tersedia secara komersial dan dapat menghasilkan vaksin dalam waktu yang relatif singkat (12 jam) (Ali et al. 2005b). Namun, metode ini juga memiliki kelemahan diantaranya: (1) Memerlukan tahap kloning dan sekuensing; (2) Memerlukan beberapa enzim untuk pemotongan (restriksi), penyambungan (ligasi), serta untuk amplifikasi berharga mahal; (3) Memerlukan penambahan bahan-bahan induksi untuk ekspresi protein (seperti *isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside* /IPTG); (4) Memerlukan peralatan khusus untuk memecah dinding sel bakteri inang (sonikator); (5) Vaksin yang dihasilkan tercampur dengan protein bakteri inang sehingga membutuhkan proses pemurnian; (6) Jumlah vaksin yang dihasilkan sangat tergantung dari kondisi pertumbuhan bakteri yang menjadi inang; (7) Dibutuhkan nutrisi yang lebih banyak karena selain diperlukan untuk membuat vaksin tersebut juga untuk memelihara kelangsungan hidup inang; dan (8) Sulit digunakan untuk menghasilkan vaksin yang beracun, karena dapat membunuh inang penghasil (Ali et al. 2005a; 2005b; 2005c).

## TEKNOLOGI TRANSKRIPSI DAN TRANSLASI *IN VITRO*

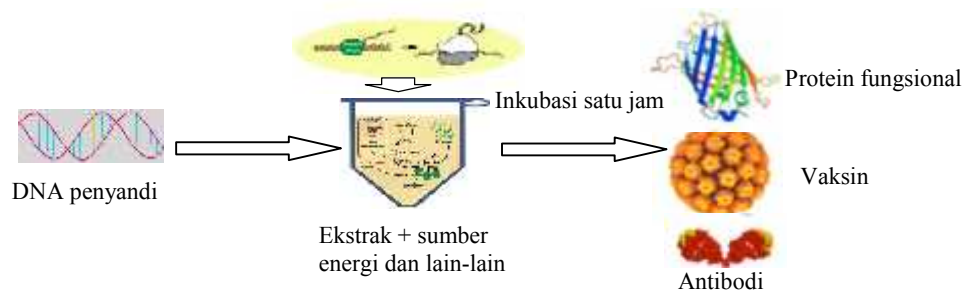
Teknologi transkripsi dan translasi *in vitro* dikenal dengan banyak nama, diantaranya teknik ekspresi protein *in vitro*, sistem ekspresi tanpa sel (*cell-free expression system*), maupun sistem sintesis protein tanpa sel (*cell-free protein synthesis*) (Nakano et al. 2000; Spirin & Swartz 2004; Yang et al. 2004; Ali et al. 2005a).

Teknologi ini menghasilkan protein fungsional dengan menggunakan ekstrak tanaman ataupun bakteri (yang mengandung ribosom dan organel-organel sel lainnya termasuk faktor inisiasi maupun elongasi yang diperlukan untuk sintesis antigen/vaksin), ditambah *transfer ribonucleic acid* (tRNA) yang telah dimurnikan, plasmid (yang telah diperkaya dengan sekuen-sekuen yang berguna untuk mempercepat proses transkripsi translasi serta membawa gen penyandi vaksin yang akan dibuat), enzim RNA polymerase, sumber energi dan enzim pemecah sumber energi (Spirin & Swartz 2004; Yang et al. 2004; Yin & Swartz 2004). Perkembangan terkini dari teknologi tersebut telah memungkinkan penggunaan gen produk *polymerase chain reaction* (PCR) langsung sebagai pengganti plasmid, sehingga proses kloning yang memerlukan waktu dan biaya dapat dihindari (Nakano & Yamane 2004).

Melalui inkubasi bahan-bahan yang diperlukan untuk sintesis protein di atas dan penambahan beberapa *chaperon* (Spirin & Swartz 2004) pada suhu yang sesuai untuk pertumbuhan tanaman ataupun bakteri (25-37°C) selama satu jam, maka vaksin target dapat diperoleh secara langsung (Ali et al. 2005a). Untuk mempermudah pemahaman terhadap sistem teknologi transkripsi dan translasi *in vitro*, diagram sistem tersebut ditampilkan pada Gambar 2.

Berhubung proses tersebut tidak melibatkan makhluk hidup, maka produk tunggal yang dihasilkan tidak tercampur dengan berbagai protein seperti jika menggunakan teknik *in vivo* dengan bakteri, tumbuhan, maupun hewan. Selain itu, karena tidak ada pembatas antara mata ataupun tangan kita dengan reaksi, manipulasi reaksi untuk meningkatkan kuantitas maupun kualitas vaksin dapat dilakukan dengan mudah (Spirin & Swartz 2004; Ali et al. 2005a).

Sebagai sumber ekstrak, tanaman yang sering digunakan adalah biji gandum yang baru tumbuh (Kawasaki & Endo 2004; Tsuboi et al. 2008), *lysate* retikulosit kelinci (Spirin & Swartz 2004), serangga (seperti ulat sutera) dan bakteri *E. coli* (Ali et al.



**Gambar 2.** Diagram teknologi transkripsi dan translasi *in vitro*

2005a). Penggunaan sumber ekstrak di atas tergantung dari jenis dan struktur protein fungsional yang akan dihasilkan.

Kelebihan produksi protein fungsional dengan teknik transkripsi dan translasi *in vitro* adalah: (1) Waktu singkat (satu jam) (Yin & Swartz 2004); (2) Dapat menggunakan produk PCR sebagai *template* (Nakano et al. 2000); (3) Tidak memerlukan tahapan kloning dan pengecekan hasil kloning; (4) Dapat dilakukan rekayasa untuk mengembangkan fungsi dan meningkatkan aktivitas protein target (Ali et al. 2005a); (5) Menggunakan tanaman/bakteri yang mati sehingga nutrisi hanya dipakai untuk memproduksi vaksin; (6) Dapat dipergunakan untuk produksi vaksin yang beracun bagi inang; (7) Dapat dilakukan optimalisasi terhadap reaksi untuk meningkatkan jumlah vaksin yang diperoleh; dan (8) Berupa *bypass* terhadap hampir semua proses biologis sehingga dapat diaplikasikan dengan teknik robotik otomatis.

### PRODUKSI VAKSIN MENGGUNAKAN TEKNOLOGI CEPAT TRANSKRIPSI DAN TRANSLASI *IN VITRO*

Untuk mengatasi kesulitan produksi vaksin dengan menggunakan inang yang hidup, penggunaan sistem transkripsi dan translasi *in vitro* merupakan pilihan yang sangat menarik. Yang et al. (2004) melaporkan telah dihasilkannya protein vaksin untuk limfoma sel B secara cepat melalui penggunaan teknologi transkripsi dan translasi *in vitro*. Penggunaan teknologi tersebut dapat diperbesar skalanya untuk menghasilkan vaksin sesuai kebutuhan.

Tersedianya sekuen genom dari berbagai jenis sumber patogen saat ini memudahkan dilakukannya penelusuran pada berbagai jenis vaksin baru (Adu-Bobie et al. 2002). Eksplorasi vaksin dengan memanfaatkan sekuen genom tersebut disertai oleh studi genomik fungsional memunculkan istilah baru di

dunia vaksin, yaitu vaksinologi terbalik (*reverse vaccinology*). Gat et al. (2007) telah memanfaatkan sistem tersebut untuk menghasilkan vaksin dan antibodi terhadap penyakit *anthrax*.

Goerke et al. (2008) melaporkan keberhasilan produksi vaksin dengan menggunakan teknologi *in vitro* dalam skala reaksi 30-40 ml. Lebih lanjut dilaporkan bahwa vaksin yang dihasilkan dengan teknologi tersebut dapat meningkatkan daya tahan (*survival rate*) mencit sampai 20-30% ketika diuji tantang dengan tumor ganas. Berdasarkan hasil penelitian di atas dapat disimpulkan bahwa teknologi tersebut telah berhasil digunakan untuk membuat vaksin aktif yang kuantitas dan kualitasnya tidak berbeda dengan vaksin yang dibuat secara konvensional.

Vaksin rekombinan terhadap botulinum telah dihasilkan dengan menggunakan teknologi transkripsi dan translasi *in vitro* (Zichel et al. 2010). Berkat teknologi tersebut, berbagai macam modifikasi untuk meningkatkan kualitas maupun kuantitas vaksin tersebut dapat dilakukan dengan mudah, diantaranya seperti penambahan enzim disulfide isomerase (PDI) yang ditujukan untuk meningkatkan bentuk alami dari vaksin sehingga jumlah vaksin yang dapat dihasilkan dapat mencapai 1 mg/ml.

Penggunaan teknologi *in vitro* ini masih difokuskan untuk mendapatkan cara menghasilkan vaksin tercepat dengan kemurnian dan kualitas terbaik. Penelitian menyangkut penggunaan vaksin yang dihasilkan langsung kepada manusia belum dilaporkan. Kelemahan vaksin yang dihasilkan dengan teknik ini adalah kuantitas vaksin yang dihasilkan sedikit, karena terjadi degradasi oleh enzim protease dari sisa ekstrak yang digunakan (Ali et al. 2005b). Untuk mengatasi hal ini, beberapa upaya telah dilakukan diantaranya penggunaan ekstrak dari bakteri *E. coli* yang telah dimutasi gen-gen penyandi enzim proteasenya (Ali et al. 2005c).

## UPAYA MENINGKATKAN KUALITAS VAKSIN

Keterbatasan penggunaan teknologi transkripsi dan translasi *in vitro* untuk menghasilkan vaksin dan protein fungsional lainnya adalah terjadinya pemecahan (degradasi) vaksin oleh enzim protease yang terdapat pada ekstrak tanaman ataupun ekstrak bakteri yang digunakan (Ali et al. 2005b). Enzim-enzim protease yang masih terdapat pada ekstrak tersebut akan memecah protein-protein rekombinan yang dihasilkan, sehingga jumlah vaksin yang dihasilkan menurun.

Enzim protease yang bersifat degradatif tersebut antara lain enzim protease yang disandi oleh gen-gen Lon, ClpP, DegP dan OmpT (Ali et al. 2005b; 2005c). Gen Lon dan ClpP merupakan gen penyandi enzim protease serin dari *E. coli* yang terdapat pada sitoplasma. Gen DegP dan OmpT masing-masing merupakan gen penyandi enzim protease serin dari *E. coli* yang terdapat pada periplasma dan membran luar (*outer-membrane*). Untuk itu, penggunaan ekstrak bakteri mutan yang tidak memiliki enzim tersebut diduga akan menghasilkan antibodi dalam jumlah yang lebih banyak.

Untuk membuktikan hipotesis di atas, (Ali et al. 2005c) telah memodifikasi gen bakteri *E. coli* BW25113 untuk menghasilkan mutan yang tidak memiliki gen penyandi enzim Lon, ClpP, DegP dan OmpT. Melalui teknik perusakan kromosom yang dilanjutkan dengan transduksi menggunakan bakteriofage P1 (*one step chromosomal disruption-P1 phage transduction method*), Ali et al. (2005c) telah berhasil memperoleh mutan di atas, baik mutan tunggal ( $\Delta lon$ ,  $\Delta clpP$ ,  $\Delta degP$  dan  $\Delta ompT$ ) maupun ganda ( $\Delta degP-ompT$ ,  $\Delta degP-lon$ ,  $\Delta lon-ompT$  dan  $\Delta clpP-ompT$ ).

Mutan di atas dipakai untuk membuat ekstrak yang selanjutnya digunakan dalam produksi salah satu protein fungsional yaitu antibodi anti-6D9 dan scFv dari *anti-human serum albumin* (anti-HSA) pada ekspresi dengan sistem transkripsi dan translasi *in vitro*. Hasil pengujian dengan *sodium-dodesyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis* (SDS-PAGE) yang dilanjutkan dengan autoradiografi menunjukkan bahwa penggunaan ekstrak mutan ganda menghasilkan kedua antibodi di atas dalam jumlah yang jauh lebih banyak dibandingkan dengan jumlah antibodi yang dihasilkan dengan penggunaan ekstrak mutan tunggal maupun tanpa mutan (*wild type*) (Ali et al. 2005a). Selain itu, hasil uji dengan *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) menunjukkan bahwa penggunaan ekstrak mutan ganda menghasilkan antibodi yang mempunyai aktivitas lebih tinggi dalam berikatan dengan antigen dibandingkan dengan yang dihasilkan dengan ekstrak mutan tunggal maupun tanpa mutan (Ali et al. 2005a).

Penggunaan ekstrak mutan ganda tersebut, terutama mutan  $\Delta degP-ompT$ , mampu menghasilkan

antibodi sebanyak yang dihasilkan oleh sistem hibridoma yaitu sekitar 20  $\mu\text{g/ml}$ . Untuk itu, penggunaan mutan tersebut sebagai sumber ekstrak sangat bermanfaat baik untuk produksi berbagai macam protein fungsional, vaksin, antibodi maupun untuk tujuan skrining terhadap pustaka gen penyandi protein fungsional tertentu yang memerlukan waktu cepat (Ali et al. 2005a).

Berhubung manfaat dari mutan baru yang dihasilkan tersebut dalam produksi antibodi menggunakan *cell-free*, maka mutan ganda tersebut sampai saat ini terus dipakai sebagai sumber ekstrak untuk membuat berbagai macam antigen, antibodi, enzim dan protein fungsional lainnya (Ali 2006).

## PROSPEK TEKNOLOGI TRANSKRIPSI DAN TRANSLASI *IN VITRO* UNTUK MENGHASILKAN PROTEIN FUNGSIONAL LAINNYA

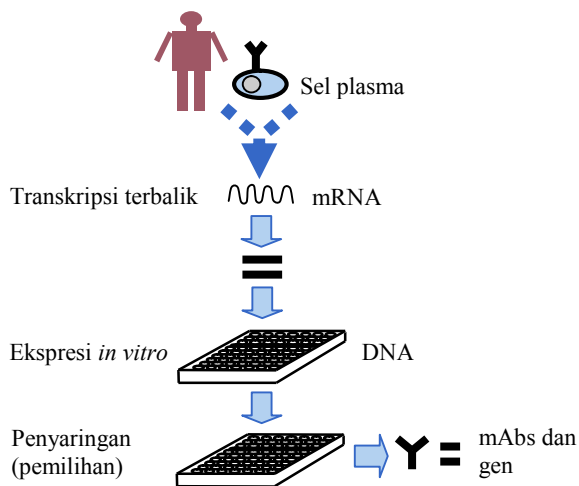
Teknik ini tidak hanya dipergunakan untuk menghasilkan vaksin (Bommakanti et al. 2010; Lu et al. 2014), tetapi juga dipergunakan untuk berbagai keperluan seperti mempelajari sistem *folding* pada sintesis enzim, hormon, protein transpoter dan jenis protein lainnya (Yang et al. 2000), produksi antibodi monoklonal (Ali et al. 2005a; 2006) atau rekayasa antibodi (Nakano & Yamane 2004). Aplikasi ini diiringi dengan upaya perbaikan, baik terhadap ekstrak bakteri yang digunakan (Ali et al. 2005a), sumber energi, jenis bioreaktor maupun aplikasinya dengan teknologi lain untuk meningkatkan penggunaan teknologi transkripsi dan translasi *in vitro* (Ali et al. 2006).

Seiring dengan ditemukannya urutan DNA aneka jenis gen dari berbagai makhluk hidup saat ini, penentuan fungsi dan peranan gen tersebut beserta jenis protein yang dihasilkan dapat diketahui secara cepat dengan menggunakan sistem ekspresi transkripsi dan translasi *in vitro* (Sabrina et al. 2010).

Antibodi monoklonal merupakan protein fungsional yang paling banyak dibuat dengan menggunakan teknologi transkripsi dan translasi *in vitro*. Sampai saat ini, teknologi produksi antibodi monoklonal hanya mampu menghasilkan antibodi mencit. Hal ini disebabkan karena *myeloma* yang diperoleh dari mencit hanya mampu menyatu (*fusi*) dengan sel limfosit mencit. Walaupun penggunaan teknologi *grafting* dan *humanization* telah memungkinkan penggunaan antibodi tersebut untuk manusia, namun kedua teknologi tersebut sangat rumit dan pelaksanaannya membutuhkan biaya besar. Selain itu, antibodi yang dihasilkan masih memberikan efek samping negatif terhadap manusia, walaupun efek samping tersebut masih dapat ditoleransi.

Skrining sel penghasil antibodi monoklonal baik pada hewan maupun manusia dapat dilakukan melalui isolasi materi genetik penyandi antibodi pada sel tersebut (Wang & Stollar 2000) untuk kemudian dideteksi fungsinya dengan teknologi transkripsi dan translasi *in vitro* (Ali et al. 2006). Untuk memperoleh materi genetik dari sel, diperlukan teknologi lain yaitu teknologi *reverse transcription polymerase chain reaction* (RT-PCR) guna mengkonversi *messenger RNA* (mRNA) penyandi antibodi yang terdapat pada sel penghasil antibodi tersebut menjadi cDNA yang lebih stabil untuk diekspresikan dengan teknologi transkripsi dan translasi *in vitro*.

Teknologi transkripsi dan translasi *in vitro* dan RT-PCR sel tunggal akan membuka peluang untuk menghasilkan antibodi monoklonal untuk manusia. Berhasilnya produksi dan konstruksi pustaka gen penyandi antibodi monoklonal hepatitis B dengan menggunakan sel limposit mencit yang telah diimunisasi sebagai *template* (Ali et al. 2005a; Sabrina et al. 2010), telah memberikan harapan besar untuk menghasilkan antibodi monoklonal terhadap hepatitis B. Melalui teknologi tersebut, pustaka gen antibodi untuk menghasilkan antibodi bagi seorang pasien dapat dibuat dengan cepat melalui sintesis cDNA penyandi antibodi dengan menggunakan sel *lymposite* pasien sebagai *template*. Gambar 3 menunjukkan tahapan yang dapat dipergunakan dalam RT-PCR sel tunggal dan sistem ekspresi *cell-free* untuk menghasilkan antibodi monoklonal (mAb) manusia dengan menggunakan sel plasma pasien sebagai *template*.



**Gambar 3.** RT-PCR sel tunggal dan teknologi transkripsi dan translasi *in vitro* untuk menghasilkan antibodi monoclonal

**Sumber:** Ali et al. (2006)

Teknologi transkripsi dan translasi *in vitro* telah memberikan kontribusi yang sangat besar terhadap perkembangan bioteknologi molekuler. Klammt et al. (2008) telah menggunakan teknologi tersebut untuk mempelajari struktur protein membran integral. Protein ini sangat berperan baik untuk mengangkut produk metabolit ke luar masuk sel, menghasilkan energi sel maupun untuk komunikasi antar sel serta antar sel dengan lingkungannya tersebut yang sangat sulit untuk diproduksi secara *in vivo*. Melalui penggunaan teknologi ini, Klammt et al. (2008) telah berhasil membuat, mempelajari struktur dan fungsi beberapa protein membran integral yang sangat penting bagi dunia farmasi saat ini.

Produksi enzim dan beberapa reseptor dan *transporter* dengan menggunakan teknologi transkripsi dan translasi *in vitro* telah dilakukan oleh Betton & Miot (2008). Semua protein fungsional yang sangat sulit disintesis secara *in vivo*, dapat dibuat secara *in vitro* dalam jumlah yang memadai. Lebih lanjut, disimpulkan bahwa penggunaan teknologi tersebut memungkinkan untuk dilakukan studi biokimia terhadap protein-protein fungsional.

## KESIMPULAN

Teknologi transkripsi dan translasi *in vitro* merupakan salah satu cara yang paling cepat untuk menghasilkan berbagai vaksin seiring dengan munculnya patogen baru. Teknik ini bahkan mampu menghasilkan protein 1-10 mg per mililiter lebih tinggi jika dibandingkan dengan teknik konvensional yang hanya menghasilkan satu dosis per butir telur. Selain itu, teknologi ini dapat dipergunakan untuk mencari vaksin baru melalui ekspresi gen tertentu dari genom patogen, sehingga sangat bermanfaat dalam skrining vaksin guna mengantisipasi munculnya jenis penyakit baru (*emerging infectious disease*).

## UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih disampaikan kepada Prof Hideo Nakano dan Asisten Prof. Takaki Kojima (*Laboratory of Molecular Biotechnology, Graduate School of Agricultural Sciences, Nagoya University, Japan*) atas kesempatan yang diberikan kepada penulis sebagai *visiting researcher* untuk memperdalam teknologi transkripsi dan translasi *in vitro*. Juga kepada DIKTI, Kementerian RISTEK DIKTI Republik Indonesia yang telah membiayai bagian dari penelitian ini melalui skim penelitian unggulan strategis nasional (PUSNAS) tahun anggaran 2014-2015.

## DAFTAR PUSTAKA

- Adu-Bobie J, Capeechi B, Serruto D, Rappuoli R, Pizza M. 2002. Two years into reverse vaccinology. *Vaccine*. 21:605-610.
- Ali M, Suzuki H, Fukuba T, Jiang X, Nakano H, Yamane T. 2005a. Improvements in the cell-free production of functional antibodies using cell extract from protease-deficient *Escherichia coli* mutant. *J Biosci Bioeng*. 99:181-186.
- Ali M, Hasan R, Nakano H. 2005b. Periplasmic endoprotease, DegP, as a potential obstacle to recombinant protein production in *Escherichia coli* cell-free technology. In: Proceedings of 14<sup>th</sup> Indonesian Science Conference. p. 121-128.
- Ali M, Hasan R, Nakano H. 2005c. *Escherichia coli* mutants construction using combination of one step chromosomal disruption-P1 phage transduction methods. In: Proceedings of 14<sup>th</sup> Indonesian Science Conference. p. 89-96.
- Ali M, Hitomi K, Nakano H. 2006. Generation of monoclonal antibodies using simplified single cell reverse transcription-polymerase chain reaction and cell-free protein synthesis. *J Biosci Bioeng*. 101:284-286.
- Ali M. 2006. High-throughput monoclonal antibody production using cell-free protein synthesis [Dissertation]. [Nagoya (Japan)]: Nagoya University.
- Betton JM, Miot M. 2008. Cell-free production of membrane proteins in the presence of detergents. In: Spirin, Swartz, editors. Cell-free protein synthesis. Weinheim (Germany): Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. p. 165-178.
- Bommakanti G, Citron MP, Hepler RW, Callahan C, Heidecker GJ, Najjar TA, Lu X, Joyce JG, Shiver JW, Casimiro DR, et al. 2010. Design of an HA2-based *Escherichia coli* expressed influenza immunogen that protects mice from pathogenic challenge. *Proc Natl Acad Sci USA*. 107:13701-13706.
- Gat O, Grosfeld H, Shafferman A. 2007. *In vitro* screen of bioinformatically selected *Bacillus anthracis* vaccine candidates by coupled transcription, translation and immunoprecipitation analysis. In: *In vitro* transcription and translational protocols. 2nd ed. New Jersey (US): Humana Press. p. 211-233.
- Goerke AR, Yang J, Kanter G, Levy R, Swartz JR. 2008. Cell-free technology for rapid production of patient-specific fusion protein vaccines. In: Spirin, Swartz, editors. Cell-free protein synthesis. Weinheim (Germany): Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. p. 69-97.
- Kasson PM, Pande VS. 2008. Structural basis for influence of viral glycans on ligand binding by influenza hemagglutinin. *Biophys J*. 95:L48-L50.
- Kawasaki T, Endo Y. 2004. The wheat germ cell-free protein synthesis. In: Spirin, Swartz, editors. Cell-free protein synthesis. Weinheim (Germany): Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. p. 111-136.
- Klammt C, Schwarz D, Lehner I, Sobhanifar S, Lohr F, Zeelen J, Glaubitz C, Dotsch V, Bernhard F. 2008. Cell-free expression of integral membrane proteins for structural studies. In: Spirin, Swartz, editors. Cell-free protein synthesis. Weinheim (Germany): Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. p. 141-159.
- Lu Y, Welsh JP, Swartz JR. 2014. Production and stabilization of the trimeric influenza hemagglutinin stem domain for potentially broadly protective influenza vaccines. *Proc Natl Acad Sci USA*. 111:125-130.
- Nakano H, Kobayashi K, Ohuchi S, Sekiguchi S, Yamane T. 2000. Single-step single-molecule PCR of DNA with a homo-priming sequence using a single primer and hot-startable DNA polymerase. *J Biosci Bioeng*. 90:456-458.
- Nakano H, Yamane T. 2004. *In vitro* expression of protein with disulfide bridges and its application for a high-throughput screening system. In: Spirin, Swartz, editors. Cell-free protein synthesis. Weinheim (Germany): Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. p. 117-124.
- Sabrina Y, Ali M, Nakano H. 2010. *In vitro* generation of anti-hepatitis B monoclonal antibodies from a single plasma cell using single-cell RT-PCR and cell-free protein synthesis. *J Biosci Bioeng*. 109:75-82.
- Sahdev S, Khattar SK, Saini KS. 2008. Production of active eukaryotic proteins through bacterial expression systems: A review of the existing biotechnology strategies. *Mol Cell Biochem*. 307:249-264.
- Sezonov G, Joseleau-Petit D, D'Ari R. 2007. *Escherichia coli* physiology in Luria-Bertani broth. *J Bacteriol*. 189:8746-8749.
- Spirin AS, Swartz JR. 2004. Cell-free protein synthesis systems: Historical landmarks classification and general methods. In: Spirin, Swartz, editors. Cell-free protein synthesis. Weinheim (Germany): Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. p. 1-24.
- Tsuboi T, Takeo S, Iriko H, Jin L, Tsuchimochi M, Matsuda S, Han ET, Otsuki H, Kaneko O, Sattabongkot J, et al. 2008. Wheat germ cell-free system-based production of malaria proteins for discovery of novel vaccine candidates. *Infect Immun*. 76:1702-1708.
- Valdés R, Reyes B, Alvarez T, García J, Montero JA, Figueroa A, Gómez L, Padilla S, Geada D, Abrahantes MC, et al. 2003. Hepatitis B surface antigen immunopurification using a plant-derived specific antibody produced in large scale. *Biochem Biophys Res Commun*. 310:742-747.
- Wang X, Stollar BD. 2000. Human immunoglobulin variable region gene analysis by single cell RT-PCR. *J Immunol Methods*. 244:217-225.
- Wong S-S, Webby RJ. 2013. Traditional and new influenza vaccines. *Clin Microbiol Rev*. 26:476-92.

- Yang J, Kanter G, Voloshin A, Reydellet NM, Velkeen H, Levy R, Swartz JR. 2004. Rapid expression of vaccine proteins for B-cell lymphoma in a cell-free system. *Biotechnol Bioeng.* 89:503-511.
- Yang J, Kobayashi K, Iwasaki Y, Nakano H, Yamane T. 2000. *In vitro* analysis of roles of a disulfide bridge and a calcium binding site in activation of *Pseudomonas* sp strain KWI-56 lipase. *J Bacteriol.* 182:295-302.
- Yin G, Swartz JR. 2004. Enhancing multiple disulfide bonded protein folding in a cell-free system. *Biotechnol Bioeng.* 86:188-195.
- Zichel R, Mimran a, Keren a, Barnea a, Steinberger-Levy I, Marcus D, Turgeman a, Reuveny S. 2010. Efficacy of a potential trivalent vaccine based on Hc fragments of botulinum toxins A, B and E produced in a cell-free expression system. *Clin Vaccine Immunol.* 17:784-792.