

Pengembangan Vaksin Penyakit Jembrana pada Sapi Bali Berbasis Protein Rekombinan: Implementasi Prinsip Bioetika *Utilitarianism*

Endang Tri Margawati, Andi Utama, dan Indriawati
Pusat Penelitian Bioteknologi LIPI

ABSTRACT

Development of Jembrana Disease Vaccine in Bali Cattle Based on Recombinant Proteins: Implementation of the Utilitarianism Bioethic Principles. Jembrana disease is caused by a Lentivirus of the Retroviridae family. So far, cattle vaccination has been done to prevent from the disease using crude vaccines produced in lymph organs of the Bali cattles accutely infected with the Jembrana disease. Crude vaccines had low immunity, unstable, expensive, and limited in availability. There had been insufficient vaccine production to meet the Bali cattle population. A breakthrough technology is therefore needed to enhance production of the Jembrana vaccine as well as to improve its quality by using the DNA recombinant technology. A choice of the technology for vaccine development is still in a corridor of utilitarianism principle of the bioethics, which stated that 'produce the greatest good for the greatest numbers'. Material used in the study was a *tat* gene fragment derived from a Jembrana viral (JDV) genome. The size of the viral genome was 7,732 bp in length. The *tat* gene is a small accessory located in between the *pool* gene and the *envelope (env)* gene. The *env* gene encodes for recombinant proteins of JSU and JTM. In this study, a recombinant protein Jembrana Tat (JTat) was cloned by *pET* system that has a 6-histidin amino acid (*his-tag*) as protein fusion. This small size of protein-fusion increased efficacy of the vaccine. Presently, the expression of the recombinant protein JTat *his-tag* is being assessed through *E. coli* BL21 strain in a 200 ml LB culture medium. The success in the JTat cloning will trigger the construction of two other recombinant proteins of JSU and JTM from the *env* gene that can be used as recombinant material for the Jembrana vaccine.

Key words: Jembrana vaccine, recombinant protein, cloning.

ABSTRAK

Pengembangan Vaksin Penyakit Jembrana pada Sapi Bali Berbasis Protein Rekombinan: Implementasi Prinsip Bioetika *Utilitarianism*. Penyakit Jembrana pada sapi Bali disebabkan oleh virus yang termasuk dalam kelompok Lentivirus dari famili Retroviridae. Selama ini pencegahan dilakukan dengan vaksinasi menggunakan *crude vaccine* berasal dari organ limpa sapi Bali terserang akut penyakit Jembrana. *Crude vaccine* mempunyai daya imunogenitas rendah, tidak stabil, mahal, dan ketersediaannya terbatas atau tidak imbang antara jumlah vaksin dan jumlah populasi sapi Bali. Pengembangan vaksin Jembrana oleh karenanya dirasa perlu untuk meningkatkan mutu dan kuantitas vaksin Jembrana. Guna memenuhi keperluan tersebut pendekatan dengan teknologi DNA rekombinan utamanya pada protein rekombinan adalah terobosan yang tepat untuk penyediaan vaksin Jembrana berbasis molekuler. Pemilihan teknologi tersebut untuk pengembangan vaksin masih termasuk dalam salah satu prinsip dari teori bioetika, yaitu prinsip *utilitarianisme* bahwa menghasilkan bahan atau barang yang sangat besar untuk jumlah yang sangat besar. Sebagai bahan vaksin rekombinan digunakan potongan gen yang berasal dari genom virus Jembrana. Diketahui bahwa genom JDV berukuran 7.732 pb. Salah satu gen da-

lam genom JDV, yaitu gen *tat* yang merupakan asesoris kecil terletak di antara gen *pol* dan gen *env*. Gen *env* dapat menyandi protein rekombinan JSU dan JTM. Sementara ini telah dikloning protein JTat dengan sistem *pET* yang mempunyai fusi protein *his-tag* berukuran 6 histidin. Ukuran fusi *tag* yang sangat kecil ini menjadikan protein rekombinan JTat yang dihasilkan mempunyai efikasi tinggi. Sistem ekspresi melalui *E. coli* BL-21 saat ini sedang diuji dalam skala laboratorium (200 ml kultur). Keberhasilan kloning JTat sebagai vaksin rekombinan Jembrana ini akan mendorong untuk perakitan *clone* dari sumber gen *env* (JSU dan JTM) sebagai bahan vaksin rekombinan Jembrana lainnya.

Kata kunci: Vaksin Jembrana, protein rekombinan, kloning.

PENDAHULUAN

Pernahkan terpikir bahwa suatu ketika bahwa dalam kehidupan di dunia akan musnah karena tidak diperolehnya obat-obatan untuk menyembuhkan berbagai penyakit. Disatu pihak kehadiran teknologi maju (*advanced technology*) yang berbasis molekuler menawarkan kemudahan, efisiensi, dan murah dalam memproduksi sementara di lain pihak masih terdapat celah kemungkinan adanya kekhawatiran akan efek dari terobosan teknologi maju tersebut. Manusia diberi akal dan jiwa, dilain pihak juga perlu mengembangkan suatu bahan obat-obatan yang berkualitas, murah, aman, dan bermanfaat untuk makhluk hidup banyak. Berangkat dari makna bioetika yang hadir ditengah-tengah maraknya tuntutan hidup yang harus dipenuhi, maka definisi bioetika perlu dipahami dan dicermati secara bijaksana. Bioetika merupakan gabungan dari berbagai disiplin ilmu yang memperhatikan etika, legalitas, dan pertanyaan (kekhawatiran) sosial yang ditimbulkan akibat kemajuan-kemajuan dalam perobat-obatan, ilmu, dan bioteknologi (Mephram 2005). Kemajuan dibidang ilmu dengan teknologi molekuler sebagai *tool*, akan sangat bermanfaat untuk mengatasi kekurangan dalam penyediaan obat-obatan dan pangan (*food*) apabila teknologi dan materi penelitian di-pilih secara arif.

Sapi Bali sebagai sapi potong lokal Indonesia dan merupakan salah satu *gene pools* sapi potong di Asia Tenggara, mempunyai kelebihan dalam hal daya reproduksinya yang mampu bereproduksi hampir 1 tahun sekali. Selain itu mempunyai beberapa kelebihan karakteristik produksi dagingnya *lean* (tanpa lemak), *juicy*, dan halus tekstur dagingnya serta relatif tinggi persentase ($\pm 50\%$) karkasnya (bagian yang dapat di konsumsi) dibandingkan dengan sapi potong lokal Indonesai lainnya. Namun, sapi Bali mempunyai kelemahan rentan terhadap penyakit virus Jembrana (Chadwick *et al.* 1995). Kematian yang diakibatkan oleh penyakit Jembrana dapat mencapai 20% dari populasi sapi Bali (Moll 1998). Distribusi sapi Bali hingga saat ini sudah hampir menyeluruh di kepulauan Indonesia bahkan menurut pengamatan terakhir sampai Malaysia. Padahal sebelumnya di era kolonialisasi Belanda hanya dibatasi penyebarannya di pulau Bali untuk menjaga kemurnian genetik sapi Bali. Seperti diketahui bahwa sampai saat ini keperluan akan vaksin Jembrana untuk keperluan vaksinasi, baru terpenuhi dari *crude vaccine*. Pengadaan *crude vaccine* secara perhitungan ekonomi mahal, karena harus mematikan hewannya terlebih dahulu untuk memproduksi *crude vaccine*. Selain itu juga kurang efektif dan rendah produksinya.

Sejalan dengan pemilihan *tool* yang arif dan bijaksana, pengembangan vaksin Jembrana untuk memenuhi kebutuhan dalam jumlah yang besar berkaitan dengan meningkatnya populasi ternak sapi Bali, sangatlah tepat untuk memilih teknologi rekombinan DNA

yang utamanya pada rekombinan protein. Hal ini karena vaksin yang awalnya diperoleh dari organ sapi Bali yang terserang akut penyakit virus Jembrana, diketahui sangat kurang ketersediaannya untuk keperluan di lapang selain kurang efektif, juga mahal dalam produksinya. Pemilihan teknologi protein rekombinan dapat dihasilkan vaksin dalam jumlah besar, aman, dan berkualitas serta efisien dalam distribusinya. Pemikiran demikian ternyata sejalan dengan salah satu prinsip bioetika, yaitu *utilitarianism principle* yang mana mengutamakan hasil atau produk yang sangat besar untuk keperluan dalam jumlah sangat besar (Bentham 1907, Mill 1998). Oleh karena itu dalam makalah ini dilaporkan hasil penelitian kloning dengan sistem *pET* dari salah satu gen virus Jembrana Tat yang diekspresikan melalui sel inang *Escherichia coli* strain BL21 untuk menghasilkan protein rekombinan dalam jumlah besar. Keberhasilan ini memicu untuk melakukan kloning dengan gen virus lainnya, yaitu JSU dan JTM. Protein rekombinan yang dihasilkan akan digunakan sebagai bahan vaksin Jembrana setelah dilakukan uji lapang (*field trial*).

BAHAN DAN METODE

Isolasi Gen *tat*

Gen *tat* diisolasi dari JTat *pGEX* dan total RNA (tRNA) dikoleksi dari limpa terinfeksi penyakit Jembrana akut. Amplifikasi potongan (fragmen) gen *tat* dilakukan dengan PCR dan RT-PCR untuk tRNA.

Kloning Gen *tat* ke dalam Plasmid *pET*

Dilakukan pemotongan plasmid *pET* dan fragmen *tat*, masing-masing dengan enzim restriksi *EcoRI* dan *SalI*. Konfirmasi plasmid *pET* dan gen *tat* divisualisasi pada gel agarose 1%. Ligasi gen *tat* dengan *pET* menggunakan enzim T4 ligase, kemudian ditransformasi ke dalam *E. coli* strain JM109. Konfirmasi klon pembawa gen *tat* dilakukan dengan PCR untuk skrining dan kemudian dilakukan sekuensing.

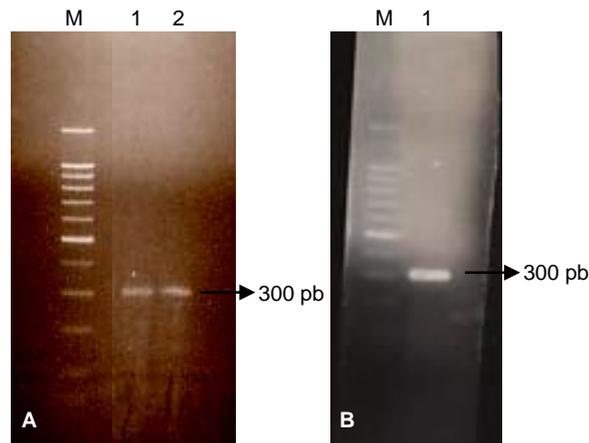
Ekspresi Protein Rekombinan JTat *his-tag*

Plasmid *pET* positif pembawa gen *tat* ditransformasi ke dalam *E. coli* strain BL 21. Ekspresi protein rekombinan JTat *his-tag* dilakukan pada media kultur LB 200 ml dengan induksi IPTG dan dikarakterisasi ukuran proteinnya dengan metode SDS-PAGE.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Kloning Gen *tat* Sistem *pET*

Seperti diketahui bahwa penelitian ini menggunakan sumber dari DNA JTat *pGEX* dan dari total RNA (tRNA) organ limpa yang terinfeksi penyakit Jembrana akut. Oleh karena itu kloning dilakukan dengan insersi gen dari kedua sumber DNA tersebut. Hasil koleksi tRNA dari organ limpa, setelah melalui *reverse transcriptase* PCR (RT-PCR) diperoleh banyak cetakan (*copies*) potongan (fragmen) cDNA. Sementara hasil koleksi sumber DNA dari JTat *pGEX* diamplifikasi dengan PCR untuk memperoleh cetakan potongan DNA. Kedua hasil PCR diperoleh dengan ukuran ± 300 pb, keduanya ditampilkan pada Gambar 1 (A = hasil RT-PCR dan B = hasil PCR). Ukuran potongan fragmen tersebut telah sesuai dengan ukur-



Gambar 1. Hasil elektrophoresis. RT-PCR (A) dan PCR (B) dengan primer Jtat2F dan Jtat2R (M = DNA Ladder 100 bp, 1 dan 2 = cDNA Jtat 300 pb).

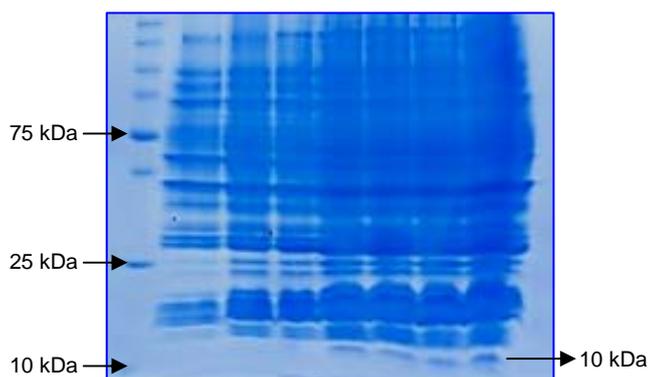
an fragmen gen *tat* (*accession number* U21603). Pada kedua proses RT-PCR dan PCR menggunakan primer yang dirancang (Jtat2F dan Jtat2R) yang mempunyai daerah pemotongan untuk enzim restriksi *EcoRI* dan *Sall*.

Sebelum ligasi, fragmen gen *tat* dan plasmid *pET-21b* dipotong dengan *EcoRI* dan *Sall*. Hasil potongan tersebut kemudian diligasikan dengan enzim T4 ligase, kemudian ditransformasi ke *E. coli* strain JM109 dan dikulturkan pada medium LB padat mengandung ampicillin. Hasil koloni yang tumbuh diskriminasi untuk konfirmasi bahwa kloning sudah terjadi atau berhasil dengan PCR. Hasil PCR menunjukkan bahwa dari 10 sampel koloni, 4 di antaranya menunjukkan hasil positif, dengan demikian keempat koloni positif tersebut membuktikan plasmid *pET-21b* pembawa gen *tat*.

Plasmid pembawa gen *tat*, setelah disekuensing (dengan automatic ABI prism 310 DNA analyzer di Puslit Bioteknologi LIPI, Cibinong) menunjukkan bahwa pada plasmid *pET-21b* memuat runutan nukleotida gen *tat* setelah dianalisis dengan BLASTn melalui NCBI. Setelah dikonfirmasi, runutan nukleotida tersebut telah sesuai 100% dengan fragmen gen *tat* yang dipublikasi (*accession number* U21603).

Ekspresi Protein Rekombinan JTat *his-tag*

Hasil uji ekspresi protein rekombinan JTat *his-tag* tersebut, kemudian diekspresikan melalui *E. coli* strain BL21. Uji ekspresi dilakukan dalam skala 20 ml media kultur LB cair dengan sistem *pET* (Novagen 2003). Karakterisasi hasil uji ekspresi JTat *his-tag* dilakukan dengan SDS-PAGE (Gambar 2). Gambar 2 menunjukkan bahwa hasil ekspresi masih tipis, namun telah menunjukkan ukuran protein rekombinan JTat yang sesuai, yaitu $\pm 11,5$ kDa. Ukuran protein ini sesuai dengan ukuran protein JTat (10,7kDa) dan fusi *his-tag* kurang dari 1 kDa. Pengulangan uji ekspresi ini masih harus diulang sampai diperoleh pita protein yang tebal, selanjutnya dilakukan purifikasi dengan *western blotting* (WB).



Gambar 3. Ekspresi JTat *his-tag* melalui *E.coli* BL-21.

KESIMPULAN

1. Menuju usaha peternakan sapi potong Bali berkelanjutan, sudah seharusnya pemikiran ke arah kesehatan hewan untuk mempertahankan *gene pool* sapi potong Bali di negeri sendiri perlu dilakukan dengan tetap berpijak pada teori bioetika terutama prinsip *utilitarianisme*.
2. Pengembangan vaksin Jembrana untuk sapi Bali yang efisien, berkualitas, aman, dan dapat diproduksi dalam jumlah besar tanpa meninggalkan prinsip bioetika, sudah berhasil direalisasi menggunakan DNA *recombinant tool*.
3. Kloning protein rekombinan Jembrana Tat (JTat) dengan sistem *pET* telah berhasil dilakukan dan uji ekspresi dalam skala laboratorium (200 ml) telah dilakukan. Protein rekombinan JTat *his-tag* ini selanjutnya perlu dipurifikasi dan diproduksi dalam skala medium untuk keperluan *field trial*.
4. Keberhasilan ini mendukung untuk dilanjutkannya kloning untuk gen virus lainnya (SU dan TM).

DAFTAR PUSTAKA

- Bentham, J. 1907.** An introduction to the Principles of Morals and Legislation. Clarendon Press. Library of Economics and Liberty. <http://www.enclib.org/library/Bentham/bnthPML1.html>. Akses 12 June 2008.
- Chadwick, B.J., R.J. Coelen, G.E. Wilcox, L.M. Sammels, and G. Kertayadnya. 1995.** Nucleotide sequence analysis of Jembrana disease virus: A bovine lentiviruses associated with an acute disease syndrome. *J. Gen. Virol.* 76(7):1637-1650.
- Mepham, B. 2005.** Bioethics: An introduction for the biosciences. BEE-j. Vol. 6. Oxford University Press. UK. 402 p.
- Mill, J.S. 1998.** Utilitarianism. <http://www.friesian.com/bentham.html>. Akses 12 June 2008.
- Moll, H. 1998.** Report of the UNOPS Marketing and Rural Finance Expert. *In* Supervision Report, Eastern Islands Smallholder Farming Systems and Livestock Development Project. United Nations Office for Project Services (UNOPS), 18 September 1998. p. 65-69.
- Novagen. 2003.** *pET* system manual. <http://www.novagen.com>. Akses 16 Juni 2008.