

KONSTRUKSI DAN KLONING PLASMID pCDNA3.1 (+) DENGAN SUBGENOTIP B3 HEPATITIS B CORE ANTIGEN (HBcAg) SEBAGAI KANDIDAT VAKSIN DNA HEPATITIS B

Raudatul Jannah¹, Lalu Unsunnidhal²

¹Kebidanan, STIKES Yarsi Mataram

raudatul.unsun.10desember2017@gmail.com

²Pendidikan Kedokteran Hewan, Universitas Nusa Tenggara Barat
unsun.nidhal@gmail.com

Abstract

Hepatitis B virus (HBV) is a DNA virus that causes hepatitis in humans. DNA vaccines are made by inserting DNA or genes that encode immunogenic proteins into eukaryotic expression vectors. One of the structural genes of HBV that is used as a source of DNA vaccines is the HBcAg gene (HBV / B B3 subgenotype). The purpose of this study was to construct and clone the plasmid pcDNA 3.1 (+) with the HBcAg gene. Confirmation of the SB3-HBcAg gene in the recombinant DNA was carried out by the restriction method and PCR, then confirmation of the base sequence was carried out by the sequencing method. Confirmation data from restriction and PCR obtained were analyzed using a descriptive approach and confirmation data from sequencing were analyzed using ClustalW software. the results showed that the plasmid pcDNA 3.1 (+) with the optimized SB3-HBcAg gene was successfully constructed and cloned.

Keyword: HBV, DNA Vaccine, HBcAg

Pendahuluan

Virus Hepatitis B (HBV) merupakan virus DNA yang menyebabkan penyakit hepatitis pada manusia. Diperkirakan sebanyak 2 miliar manusia telah terinfeksi, 350 juta diantaranya telah berkembang menjadi infeksi kronis yang menyebabkan 600.000 kematian setiap tahunnya (*World Health Organization*, 2012). Indonesia merupakan salah satu negara yang memiliki prevalensi HBsAg tertinggi, yaitu mulai dari 2,5% hingga 10% (Gunardiet *al*, 2014), dengan tingkat tertinggi dilaporkan di Sulawesi utara sebanyak 33,0%, Papua sebanyak 12,8% dan terendah di Jakarta 4,0% (Watyet *al*, 2017).

Terapi untuk hepatitis B kronis dapat diobati dengan pemberian interferon dan senyawa antiviral (Tenofovir dan entecavir), namun obat ini tidak dapat menurunkan semua bentuk virus DNA, seperti cccDNA. Selain itu, pengobatan jangka panjang dengan obat antiviral dapat menyebabkan toksisitas dan resistensi virus (Akbar *et al*, 2013). Oleh karena itu, pendekatan yang paling efektif untuk mengendalikan dan mencegah penyebaran HBV yaitu dengan imunisasi menggunakan vaksin yang kompeten (WHO, 2012). Salah satu jenis vaksin yang merupakan suatu terobosan baru dalam teknologi vaksin adalah vaksin DNA. Vaksin DNA dibuat dengan menyisipkan DNA atau gen yang

mengkode protein immunogenik ke dalam vektor ekspresi eukariotik.

Salah satu gen struktural dari HBV yang digunakan sebagai sumber vaksin DNA adalah gen HBcAg (HBV/B subgenotip B3). HBcAg dipilih sebagai kandidat vaksin karena lebih spesifik untuk limfosit T sitotoksik (CTL) dalam hati. CTL mensekresi sitokin TNF- α dan interferon γ , dimana keduanya akan mempengaruhi hepatosit yang terinfeksi, sehingga replikasi HBV pada sel tersebut dapat dihambat (Lokhande, 2011).

Hasil penelitian Rolland, (2001) menyatakan bahwa HbcAg berhasil diekspresikan di *E. coli* pada prokariota dan eukariota dalam bentuk yang tidak larut. Penelitian yang dilakukan oleh waty, (2017) melaporkan bahwa HBcAg berhasil diekspresikan pada *E. coli* dalam bentuk larut dengan menggunakan vektor yang berbeda. Namun, penelitian ini belum pernah dilakukan pada plasmid yang diekspresikan di mamalia (pcDNA3.1 (+)) sebagai kandidat vaksin DNA. Oleh karena itu peneliti tertarik untuk melakukan penelitian tentang “Konstruksi dan Kloning Plasmid pcDNA3.1 (+) dengan subgenotip B3 hepatitis B core antigen (HBcAg) sebagai kandidat vaksin DNA hepatitis B”.

Metode Penelitian

Rancangan Kegiatan

Penelitian ini tergolong ke dalam kelompok penelitian eksperimental laboratorik. Secara garis besar, pelaksanaan penelitian ini terbagi menjadi lima tahapan penelitian:

1. Tahap pertama adalah mendesain dan mengoptimasi kodon gen SB3-HBcAg. Gen SB3-HBcAg.
2. Tahap kedua adalah mendapatkan vektor pcDNA3.1 (+) sebagai *backbone*. DNA rekombinan pcDNA-Env-TM JDV direstriksi menggunakan enzim *BamHI* dan *EcoRI* sehingga mendapatkan plasmid pcDNA 3.1 (+) saja. Berikut skema konstruksi DNA rekombinan pcDNA-Env-TM JDV:

GGATCC _____ *Gene of Interest* _____ GAATCC
BamHI nnn *EcoRI*

Gambar 3.1. Skema konstruksi DNA Rekombinan pcDNA-Env-TM JDV

Dilanjutkan dengan ligasi gen SB3-HBcAg dengan pcDNA 3.1 (+) yang telah teristriksi.

3. Tahap Ketiga adalah Transformasi
4. Tahap Keempat adalah Isolasi DNA dari bakteri transforman positif
5. Tahap Kelima adalah konfirmasi dengan menggunakan enzim restriksi *MluI* dan *XhoI*, penggunaan enzim tersebut juga sekaligus untuk mengkonfirmasi hasil ligase dari gen SB3-HBcAg dengan pcDNA 3.1 (+) sehingga membentuk DNA rekombinan pcDNA 3.1-SB3-HBcAg.
6. Tahap Keenam adalah konfirmasi dengan teknik PCR (*Polymerase Chain Reaction*) dengan menggunakan sepasang Primer spesifik untuk mendeteksi gen SB3-HBcAg pada DNA rekombinan pcDNA 3.1-SB3-HBcAg.
7. Tahap Ketujuh adalah konfirmasi dengan teknik *sequencing* dengan sepasang Primer Universal untuk *sequencing* urutan basa *gen insert* pada plasmid pcDNA3.1 (+) untuk mengetahui urutan basa *gen insert* pada DNA rekombinan pcDNA 3.1-SB3-HBcAg.

Ruang Lingkup Objek

Penelitian ini mencakup bidang Biomedikal

Bahan dan Alat

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah sekuen gen SB3 HBcAg dari Virus Hepatitis B kemudian dioptimasi kodon dan

disintesis dengan menggunakan jasa dari *Gene Universal Corp*. Vektor yang digunakan adalah pcDNA 3.1 (+) yang berasal dari Laboratorium Mikrobiologi, Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Nusa Tenggara Barat, vektor tersebut didapatkan dengan bentuk DNA rekombinan (pcDNA-Env-TM JDV). *Host* yang digunakan adalah *E. coli* DH5a sebagai *host* pada proses kloning untuk memperbanyak plasmid DNA rekombinan yang berasal dari Laboratorium Mikrobiologi, Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Nusa Tenggara Barat. Kit *Agarose Gel Extraction Kit* (Jena Bioscience) untuk proses ekstraksi plasmid pcDNA 3.1 (+) yang berasal dari Laboratorium Mikrobiologi, Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Nusa Tenggara Barat. Selanjutnya, *Bacteriological Pepton* (Oxoid), *Yeast Extract* (Oxoid), *Bacteriological NaCl* (Oxoid), *Bacto Agar* (Oxoid) untuk pembuatan Medium Luria Bertani (LB), Ampisilin (Sigma) untuk seleksi bakteri transforman, Plasmid DNA Extraction Maxi Kit (Favorgen Biotech Corp) untuk isolasi plasmid, enzim *BamHI*, *EcoRI*, *MluI*, *XhoI* dan buffer reaksi (Invitrogen) untuk proses restriksi, $CaCl_2$, GoTaq PCR Master Mix 2X (Promega), *Nucleace Free Water* (Qiagen), Agarosa (Lonza), SYBR Safe DNA Gel Stain (Invitrogen), Gel Stain (Transgen Biotech), Loading Dye (Qiagen), Marker DNA 1 kbp (Vivantis), Marker DNA 100 bp (Vivantis), sepasang primer deteksi gen SB3-HBcAg, sepasang primer Universal untuk *sequencing* pada plasmid pcDNA3.1 (+), Tris Acetate-EDTA buffer (Invitrogen) untuk elektroforesis DNA, Aquadest, Alkohol Absolut.

Peralatan yang diperlukan untuk penelitian ini adalah: Mikropipet (1-10 ul, 10-100 ul, 100-1000 ul) (Eppendorf), Neraca Analitik (Shimadzu), *Heat and Stirrer Plate* (Sybron), *Laminary Air Flow* (Gelman Sciences), Inkubator 37°C (LEEC), Cawan Petri Disposable, *Shaker Incubator* (New Brunswick Scientific) untuk keperluan kultivasi bakteri, Perangkat Elektroforesis Gel Agarosa (Mupid-exu), *Thermocycler* untuk PCR (Applied Biosystem) dan Lampu UV Illuminator untuk isolasi dan visualisasi asam nukelat. Selain itu, peralatan lainnya yang diperlukan adalah tabung konikal 50 ml dan 15 ml (Falcon), tabung mikrosentrifuge 1,5 ml (Axigen), *white/yellow/blue tips* (Axigen), spuit injeksi, kapas, filter 0.2 micron, mikropipet (Gilson) dan peralatan gelas lainnya.

Tempat

Penelitian ini di Laboratorium Mikrobiologi dan Bioteknologi, Fakultas Peternakan, Universitas Mataram.

Teknik Pengumpulan Data

Pengumpulan data dilakukan dengan pengamatan pada *band* hasil elektroforesis pada tahap konfirmasi menggunakan metode restriksi dan PCR. Data optimasi kodon didapat dari jasa berbayar Gene Universal dan data *sequencing* didapat dari jasa berbayar Genetika Science.

Definisi Operasional

- Kontrol negatif dalam penelitian ini adalah sel kompeten (*E. Coli* DH5 α) yang ditransformasi dengan ddH₂O tanpa DNA plasmid dan plasmid rekombinan pcDNA 3.1-SB3-HBcAg yang tidak direstriksi.
- Kontrol positif dalam penelitian ini adalah hasil PCR yang menggunakan *template* dari gen SB3-HBcAg optimasi secara langsung dari stok awal untuk transformasi dengan menggunakan sepasang primer spesifik untuk deteksi gen SB3-HBcAg.

Variabel Penelitian

Adapun yang menjadi variabel dari penelitian ini adalah konfirmasi keberhasilan konstruksi dan kloning dari plasmid rekombinan pcDNA 3.1-SB3-HBcAg.

Analisa data

Data yang didapat dari hasil pengamatan pada *band* hasil elektroforesis pada tahap konfirmasi menggunakan metode restriksi dan PCR dianalisis dan dijelaskan menggunakan pendekatan deskriptif. Kemudian, data *sequencing* yang didapat dari jasa berbayar Genetika Science dianalisis menggunakan program *online ClustalW*.

Hasil dan Pembahasan

Hasil konstruksi dan kloning gen SB3_HBcAg di plasmid pcDNA3.1 (+) dapat dilihat pada data berikut ini:

Optimization Report
Gene Universal Corp.

Before Codon Adjustment
CAI: 0,68

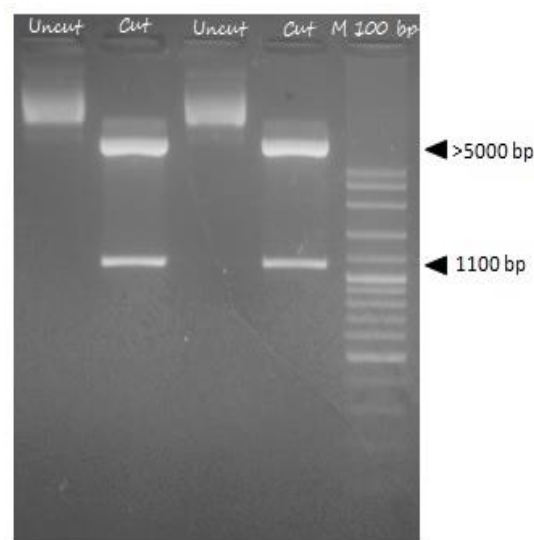
Original Codon:
ATGGACATTGACCCGTATAAAGAATTGGAGCTTCTGTGGAGTTACTCTTTTTT
GCCCTTCTGACTTCTTCTTCTTATTGAGATCTTCGACACCCGCTCTGCCTGTGA
TCGGGAGGCCTTAGAGTCTCCGGAACATTGTCACCTCACCATACGGCAGCTCAGG
CAAGCTATTTTGTGTGGGGTGGTGTGATGAATCAGCCACCTGGGTGGGAAGTA
ATTTGGAAGACCCGTCATCCCGGGAATTAGTAGTCAGTTATGCAATGTAATAT
GGGCTAAAAATCAGACAACATTGTTGGTTTTCACATTCTCTGCTTACTTTTGGAA
GAGAAACTGTTCTTGAATATTGTTGTCCTTTGGAGTGTGGATTCGCACACCTCCT
GCATATAGACCACCAAATGCCCTATCTTATCAACACTTCGGGAACTACTGTTG
TTAGACGACGAGGAGGTCCTCCCTAGAAGAAGAACCTCCCTCACCCTCGACAGCAA
GGTCTCAATCGCCGCTCGCAGAAGATCTCAATCTCGGAAATCTCAATGTTAG

Original Protein:
MDIDPYKEFGASVELLSFLPSDFPISIRDLLDTASALYREALESPEHCSPHHTALRQAI
LCWGELMNLATWVGSNLEDPASRELVSYSVNVNMGKIRQLLWFHISCLTFGRETV
LEYLVSGVWIRTPPAYRPPNAPILSTLPEVVRRRGRSPRRRTPSRRRRSQSPRRR
RSQSRESQC*

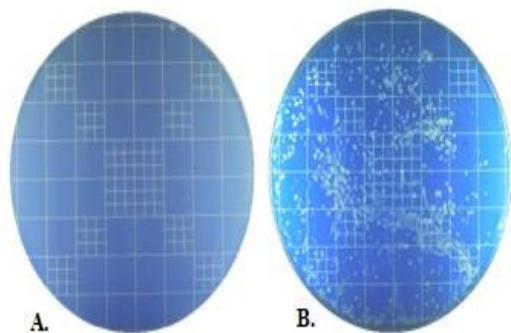
After Codon Adjustment
CAI: 0,97

Optimized Codon: Sekuen Gen SB3-HBcAg (Telah Dioptimasi) dirahasiakan oleh peneliti untuk kepentingan Paten
Optimized Protein:
MDIDPYKEFGASVELLSFLPSDFPISIRDLLDTASALYREALESPEHCSPHHTALRQAI
LCWGELMNLATWVGSNLEDPASRELVSYSVNVNMGKIRQLLWFHISCLTFGRETV
LEYLVSGVWIRTPPAYRPPNAPILSTLPEVVRRRGRSPRRRTPSRRRRSQSPRRR
RSQSRESQC*

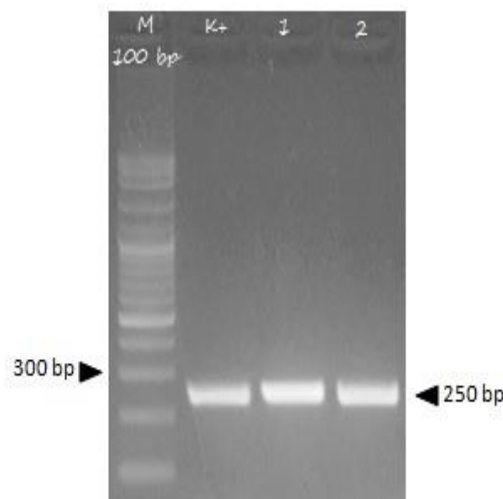
Gambar 4.1 Hasil Optimasi Kodon Gen SB3-HBcAg



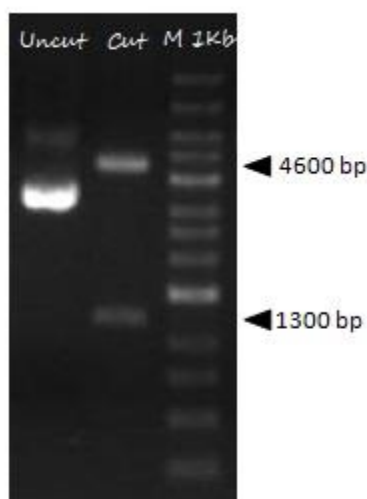
Gambar 4.2 Hasil Restriksi pcDNA-Env-TM JDV dengan BamHI dan EcoRI, untuk persiapan backbone



Gambar 4.3 Transformasi *E. coli* DH5 α dengan pcDNA 3.1-SB3-HBcAg hasil proses ligasi. Kontrol negatif transformasi (A), transformasi dengan volume inokulasi sel kompeten 100 μ l (B)



Gambar 4.6 Hasil Amplifikasi Plasmid DNA Rekombinan dengan primer deteksi gen SB3-HBcAg. Gen Sintetik SB3-HBcAg (K+) digunakan sebagai kontrol positif, sedangkan plasmid yang diisolasi dari koloni transforman (ulangan 1 dan 2) diuji untuk mendeteksi gen *insert* SB3-HBcAg, marker 100 bp (M).



Gambar 4.4 Hasil Restriksi pcDNA 3.1-SB3-HBcAg dengan MluI dan XhoI, untuk konfirmasi

```

CLUSTAL 2.1 Multiple Sequence Alignments

Sequence type explicitly set to DNA
Sequence format is Pearson
Sequence 1: Optimization      564 bp
Sequence 2: Sequencing_F     764 bp
Start of Pairwise alignments
Aligning...

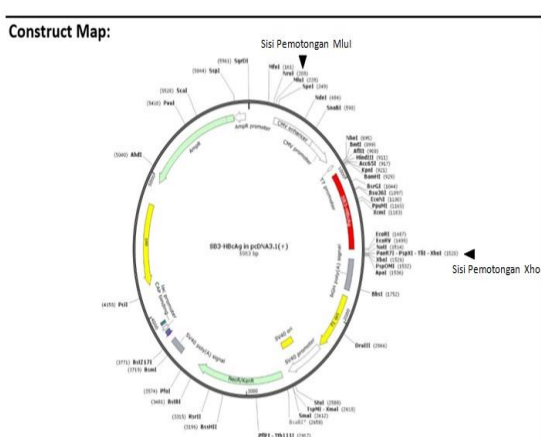
Sequences (1:2) Aligned. Score: 100
Guide tree file created: [clustalw.dnd]

There are 1 groups
Start of Multiple Alignment

Aligning...
Group 1: Sequences: 2      Score:10716
Alignment Score 4336

CLUSTAL-Alignment file created [clustalw.aln]
    
```

Gambar 4.7 Hasil pengolahan data menggunakan *Clustal W* dari hasil sequencing menggunakan Primer Universal untuk Sequencing gen *Insert* pada Plasmid pcDNA 3.1 (+) yaitu pada posisi CMV Promoter dan bGH poly(A) signal.



Gambar 4.5 Posisi Pemotongan dari enzim MluI dan XhoI pada DNA rekombinan pcDNA 3.1-SB3-HBcAg

Optimasi kodon merupakan metode rekayasa gen yang mengubah kodon yang ada dengan *synonymous codon* untuk meningkatkan produksi protein yang dikodekannya. Optimasi kodon dilaksanakan dengan menggunakan layanan jasa *Gene Universal Corp.* Urutan basa Gen SB3-HBcAg yang dioptimasi berasal dari urutan basa nukleotida gen Hepatitis B core antigen subgenotif B3 HBcAg (Waty, 2017). Hasil

optimasi kodon gen SB3-HBcAg pada gambar 4.1.

Berdasarkan laporan optimasi kodon oleh *Gene Universal Corp.* di atas didapatkan peningkatan nilai *Codon Adaptation Index* (CAI) dari angka 0,68 menjadi 0,97. CAI sendiri menghitung frekuensi penggunaan masing-masing kodon dan menghitung rata-rata geometrik frekuensi penggunaan di setiap protein pada target *Expression System* (Sharp *et al.*, 1987). Sehingga peningkatan CAI dapat mengoptimalkan ekspresi dari gen SB3-HBcAg yang mengkode protein Hepatitis B core antigen subgenotif B3.

Plasmid DNA rekombinan pcDNA-Env-TM JDV siap untuk menyumbangkan backbonenya yaitu pcDNA 3.1 (+) untuk gen sintetik optimasi SB3-HBcAg. Preparasi persiapan fragmen backbone tersebut dilakukan dengan restriksi enzim *BamHI* dan *EcoRI*. Insert gen *env-tm* terlihat sebagai pita DNA berukuran 1100 bp. Backbone pcDNA 3.1 (+) akan terlihat sebagai pita DNA berukuran di atas 5000 bp (Gambar 4.2). Backbone pcDNA 3.1 (+) tersebut akan digel-cut dan selanjutnya dipurifikasi untuk memperoleh fragmen DNA tersebut. Fragmen vektor kemudian diligasi dengan gen sintetik optimasi SB3-HBcAg menggunakan perbandingan 1:3 (perkiraan) dengan enzim T4 ligase.

Plasmid hasil dari proses ligasi ditransformasikan ke dalam *E. coli* DH5 α sebagai *host* kloning menggunakan metode *heat shock*. Pembuatan sel kompeten dilakukan secara kimia menggunakan kalsium klorida. Kontrol negatif adalah sel kompeten yang ditransformasi dengan ddH₂O tanpa DNA plasmid. Sel kompeten yang telah ditransformasi ditanam pada media seleksi dengan volume 100 μ l. Kontrol negatif transformasi menunjukkan tidak adanya pertumbuhan bakteri. Ampisilin merupakan agen bakteriosidal yang bekerja dengan cara menghambat secara irreversible aktivitas enzim transpeptidase yang dibutuhkan untuk sintesis dinding sel bakteri. Dari kontrol negatif, dapat disimpulkan bahwa bakteri *wild type* yang digunakan sebagai *host* rentan terhadap Ampisilin. Transformasi plasmid yang dilakukan menghasilkan bakteri yang resisten Ampisilin sehingga dapat tumbuh di media seleksi mengandung Ampisilin. Hal ini karena pcDNA 3.1 (+) mengandung gen resistensi Ampisilin, yaitu *AmpR*. Seiring bertambahnya volume bakteri tertransformasi yang ditanam, semakin

banyak pula bakteri resisten Ampisilin yang tumbuh pada media seleksi (Gambar 4.3).

Setelah mendapatkan bakteri transforman, bakteri transforman tersebut diperbanyak dan diisolasi plasmidnya untuk digunakan sebagai konfirmasi dengan enzim restriksi. Plasmid yang diperoleh kemudian juga perlu divisualisasikan pada gel agarosa untuk melihat integritas plasmid yang diperoleh. Plasmid tervisualisasikan sebagai tiga pita DNA berbeda pada gel agarosa. Perbedaan pita ini akibat adanya perbedaan konformasi dari satu plasmid. Pada metode ekstraksi plasmid yang didasari pada prinsip denaturasi dan renaturasi dengan *alkaline lysis*, terdapat kemungkinan bahwa plasmid akan terekstraksi dalam beberapa konformasi yaitu dimer plasmid, *open circular (nicked)*, *supercoiled (covalently closed circular)*, *irreversibly denatured supercoiled*, bahkan konformasi *linear*, dan konformasi minor dalam bentuk *linear single stranded* dan *circular single stranded* (Bimboim & Doly, 1979). Konformasi-konformasi tersebut termanifestasi sebagai berbagai macam pita DNA dengan jarak migrasi yang berbeda, walaupun hanya satu jenis plasmid yang diisolasi di awal (Gambar 4.4 dan Gambar 4.5).

Plasmid yang diperoleh juga dipotong dengan enzim *MluI* dan *XhoI* yang memotong plasmid rekombinan. Restriksi ini akan menghasilkan pita backbone plasmid rekombinan berukuran sekitar 4.600 bp dan fragmen berisikan insert berukuran sekitar 1.300 bp. Sebagai kontrol, plasmid hasil isolasi yang diperoleh juga tidak diperlakukan restriksi dan divisualisasikan di gel agarosa. Hasil restriksi ini mengkonfirmasi plasmid rekombinan dari sisi ukuran plasmid beserta ukuran fragmen yang terdapat gen *insert* di dalamnya. Penggunaan *MluI* dan *XhoI* sebagai enzim restriksi untuk mengkonfirmasi yang berbeda dengan enzim restriksi untuk backbone dan sisi penempelan pada proses ligasi yaitu *BamHI* dan *EcoRI* bertujuan untuk mengkonfirmasi bahwa gen sintetik optimasi sudah menempel dan terpasang pada backbone pcDNA 3.1 (+) (Gambar 4.4 dan Gambar 4.5)

Selanjutnya dikonfirmasi dengan metode PCR (*Polymerase Chain Reaction*) untuk mengkonfirmasi gen SB3-HBcAg pada DNA rekombinan. Hasil dari PCR kemudian divisualisasi dengan sinar UV dan didapatkan hasil yang disajikan pada Gambar 3.6. Didapatkan produk amplifikasi berukuran 250 bp (Gambar

4.6). Produk amplifikasi DNA ini merupakan produk yang didapatkan dengan menggunakan primer deteksi gen SB3-HBcAg (Sekuen Primer dirahasiakan untuk kepentingan Paten)

Hasil isolasi plasmid yang telah terkonfirmasi melalui metode PCR (*Polymerase Chain Reaction*).Kemudia dilanjutkan konfirmasi menggunakan metode sekuensing. Sebelum pengiriman sampel sekuensing ke *Genetika Science Corp.* terlebih dahulu sampel harus diamplifikasi, amplifikasi ini pun menggunakan metode *Polymerase Chain Reaction (PCR)*. Sampel diamplifikasi menggunakan primer universal untuk sekuensing pada vektor pcDNA 3.1 (+), produk amplifikasi sebesar 764 bp karena bertambahnya beberapa *base pair* milik gen CMV Promoter dan gen bGH Poly(A) signal. Hasil PCR dapat dilihat pada Gambar 4.6.

Plasmid DNA rekombinan yang telah terkonfirmasi tersisipi gen target melalui metode restriksi dan PCR kemudian disekuensing menggunakan sekuensing *forward* untuk mengetahui urutan nukleotidanya. Setelah itu, hasil sekuensing yang didapatkan selanjutnya dianalisis untuk memastikan tidak adanya mutasi pada gen target. Analisis dilakukan dengan menggunakan aplikasi *Clustal W* dengan cara membandingkan dengan sekuen gen SB3-HBcAg yang telah dioptimasi kodonnya. Berikut hasil pengolahan data menggunakan *Clustal W* (Gambar 4.6).

Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa plasmid pcDNA 3.1 (+) dengan gen sintetik SB3-HBcAg yang telah dioptimasi berhasil dikonstruksi dan dikloning.

Referensi

- Akbar SMF, Al-Mahtab M, Uddin MH, Khan SI. (2013) "HBsAg, HBcAg, and combined HBsAg/HBcAg-based therapeutic vaccines in treating chronic hepatitis B virus infection". *Hepatobiliary Pancreat Dis Int*, 12(4): 363-9.
- Birnboim HC, Doly J. (1979) "A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA". *Nucleic Acids Res.*, Nov 24;7(6):1513-23. DOI:10.1093/nar/7.6.1513.
- Gunardi H, Zaimi LF, Soedjatmiko AR, Muljono DH. (2014) "Current prevalence of hepatitis B infection among parturient women in

Jakarta, Indonesia". *Acta Med Indones*, 46: 3-9 [PMID: 24760802]

- Horvat RT, Tegtmeier GE, (2011) "Hepatitis B and D virus", in versalovic j et al, *Manual of clinical microbiology*, 10th ASM press, Washington DC, USA.
- Khoziel MJ, Thio CL (2010) "Hepatitis B virus and hepatitis delta virus", in mendel et al, *principles and practice of infection diseases 7th edition*, churchill livingston elsivier, philladelphia, USA.
- Kusumawati, A., Pranowo, D., Widada, J.S. (2002) "Construction of an eukaryotik pcDNA3.1(+)-based vector for the expression of Jembrana disease virus *gag-ca* subunit gene 1". *J. Biotech*. Dec: 578-583.
- Lokhande et al, (2011). "HBV and HCV immunopathogenesis", in mukolov SL, *Viral hepatitis, selected issues of pathogenesis and diagnostics* intech open, Croatia
- Petit MA, Pillot J. (1985) "HBc and HBe antigenicity and DNA-binding activity of major core protein P22 in hepatitis B virus core particles isolated from the cytoplasm of human liver cells". *J Virol*, 53: 543-51
- Rahmah Waty, Apon Zaenal Mustopa, Suharsono, Ratih Asmana Ningrum, Hidayah Murtiyaningsih (2017) "Soluble expression and purification of hepatitis B core antigen (HBcAg) subgenotype B3 in *Escherichia coli* using thioredoxin fusion tag", *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*, 7(8): 496-501. DOI: 10.12980/apjtd.7.2017D7-58.
- Rolland D, Gauthier M, Dugua JM, Fournier C, Delpech L, Watelet B, et al. (2001) "Purification of recombinant HBc antigen expressed in *Escherichia coli* and *Pichia pastoris*: comparison of size-exclusion chromatography and ultracentrifugation". *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 2001; 753: 51-65.
- Sambrook, Fritsch, E. F., Maniatis, T. (1989) "*Molecular Cloning: a Laboratory Manual*". Cold Spring Harbor Labory Press. USA
- Sharp, P.M., Li, W.H., (1987) "The Codon Adaptation Index—a Measure of Directional Synonymous Codon Usage Bias, and Its Potential Applications", *Nucleic Acids Res*, 15, hal. 1281-1295.
- Suharto, (2012) "Sejarah hepatitis dan pengendaliannya. Surabaya. Rumah sakit penyakit tropik infeksi-universitas airlangga.

- Williams, J.A.(2013)“Vector Design for Improved DNA Vaccine Efficacy, Safety and Production”.*Vaccine*.1: 225 – 249.
- World Health Organization*.(2012) “Hepatitis” B. Geneva: World Health Organization; [Online] Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs204/en> [Accessed on 12th May, 2018].
- Yano Y, Utsumi T, Lusida MI, Hayashi Y.(2015)“Hepatitis B virus infection in indonesia”. *word J Gastroenterol*, 21 (38): 10714-20.