

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan dengan dua metode, yaitu *in silico* dengan pendekatan bioinformatika dan konsep *reverse vaccinology* untuk pemodelan vaksin multi-epitop HMPV. Penelitian ini dilaksanakan pada Bulan Februari hingga Agustus 2025 di rumah penulis.

3.2 Alat dan Bahan

3.2.1 Alat Pemodelan Vaksin Multi-Epitop

Alat yang digunakan dalam penelitian ini merupakan perangkat keras berupa laptop Dell Latitude 5420 dengan prosesor Intel(R) Core (TM) i7-1185G7, CPU 3.00 GHz, RAM sebesar 32 GB, dan spesifikasi program Windows 11 Education. *Web server* yang digunakan pada penelitian ini disajikan pada **Tabel 3. 1**.

Tabel 3. 1 Daftar *Web Server* dan Perangkat Lunak yang Digunakan

<i>Web Server</i>	<i>Link</i>	<i>Fungsi</i>
National Center for Biotechnology Institute	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/	Basis data genom dan proteom HMPV
Basic Local Alignment Search Tool	https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi	Uji kemiripan varian HMPV
NetMHCpan-4.1	https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?NetMHCpan-4.1	Seleksi epitope CTL atau MHC I (CD8+)
NetMHCIIpan-4.1 pada IEDB	https://nextgen-tools.iedb.org/pipeline?tool=tc2	Seleksi epitop HTL atau MHC II (CD4+)
ToxinPred 3.0	https://webs.iitd.edu.in/raghava/toxinpred	Uji toksisitas epitop
AllerTOPV 2.1	https://www.ddg-pharmfac.net/allertop_test/	Uji alergenitas epitop

Epitope Conservancy Analysis	http://tools.iedb.org/conservancy/	Uji Tingkat <i>Conservancy</i> Epitop
Web server	Link	Fungsi
VaxiJen 3.0	https://www.ddg-pharmfac.net/vaxijen3/home	Uji antigenisitas epitop
IL-2Pred	https://webs.iiitd.edu.in/raghava/il2pred/	Uji kemampuan induksi IL-2
IL-4Pred	https://webs.iiitd.edu.in/raghava/il4pred/design.php	Uji kemampuan induksi IL-4
IFN- γ	https://webs.iiitd.edu.in/raghava/ifnepitope/design.php	Uji kemampuan induksi IFN- γ
PEP-FOLD4	https://bioserv.rpbs.univ-paris-diderot.fr/services/PEP-FOLD4	Prediksi struktur 3D epitop
Protein Data Bank (PDB)	https://www.rcsb.org/	Basis data struktur 3D protein
ClusPro 2.0	https://cluspro.bu.edu/login.php	<i>Molecular Docking</i>
Protein-Sol	https://protein-sol.manchester.ac.uk	Prediksi solubilitas protein
Expasy ProtParam	https://web.expasy.org/protparam/	Prediksi sifat fisikokimia protein
AlphaFold	https://alphafoldserver.com	Prediksi struktur tersier
GalaxyRefine2	https://galaxy.seoklab.org/cgi-bin/submit.cgi?type=REFINE2	Penyempurnaan struktur
Saves 6.1 - PROCHECK	https://saves.mbi.ucla.edu	Plot Ramachandran
PRODIGY	https://rascar.science.uu.nl/prodigy/	Analisis kekuatan interaksi antara vaksin dengan reseptor
PDB-Sum	https://www.ebi.ac.uk/thornton-srv/databases/pdbsum/Generate.html	Analisis residu asam amino yang berikatan dengan TLR

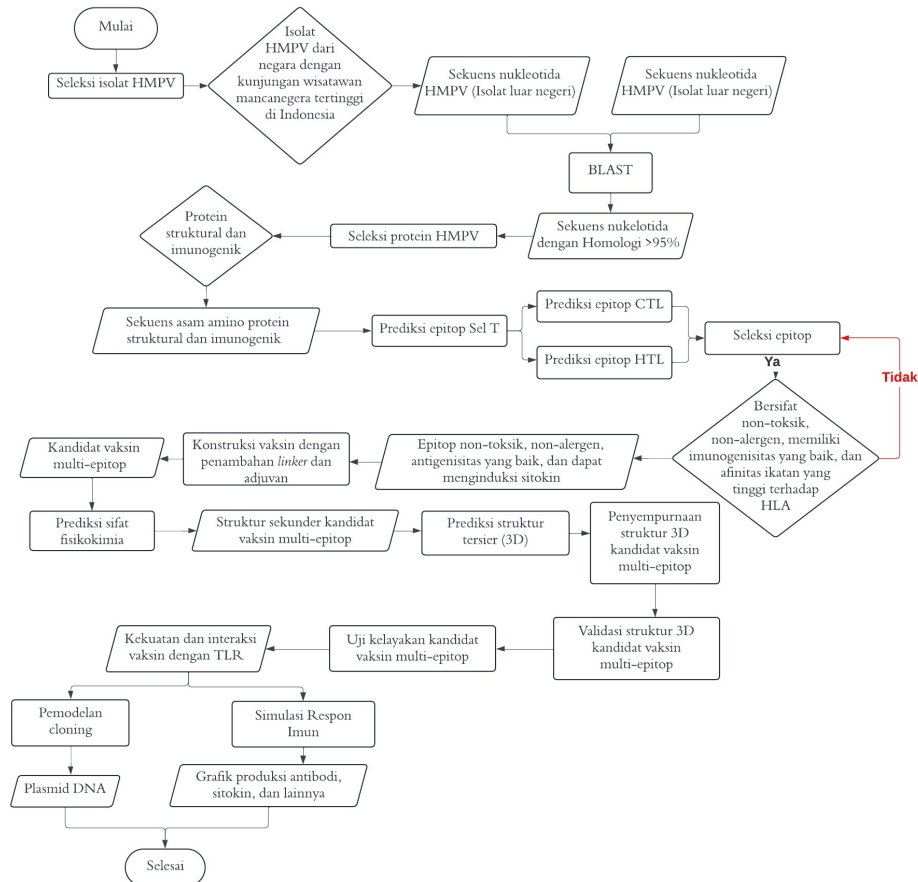
<i>Web server</i>	<i>Link</i>	<i>Fungsi</i>
EMBOSS backtranseq	https://www.ebi.ac.uk/jdispatcher/emboss_backtranseq	Translasi balik protein rekombinan vaksin
Jcat	https://jcat.de/	Optimasi kodon
SnapGene	Perangkat lunak	Desain vektor kloning
ElliPro	http://tools.iedb.org/ellipro	Prediksi epitop sel B
VaxiJen 3.0	https://www.ddg-pharmfac.net/vaxijen3/	Uji antigenisitas epitop

3.2.2 Bahan Pemodelan Vaksin Multi-Epitope

Bahan yang digunakan pada penelitian ini diperoleh dari *web server* serta penelitian sebelumnya, yaitu isolat HMPV (urutan nukleotida dan asam amino utuh) yang diperoleh dari NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), HLA kelas I dan II, *Toll-Like Receptor* (TLR) 2 dan 4 yang diperoleh dari Protein Data Bank (PDB) (<https://www.rcsb.org/>), *linker*, dan adjuvan.

3.3 Bagan Alir Penelitian

3.3.1 Bagan Alir Pemodelan Vaksin Multi-Epitop



Gambar 3. 1 Bagan Alir Penelitian

3.4 Prosedur Penelitian Pemodelan Vaksin Multi-Epitop

3.4.1 Seleksi Isolat dan Protein Antigenik HMPV

Data genom dan proteom HMPV diperoleh dari basis data National Center for Biotechnology Information (NCBI) yang merupakan salah satu sumber paling otoritatif (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Berdasarkan basis data NCBI Virus (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/virus/>), terdapat 581 jenis isolat HMPV yang diisolasi dari jaringan atau spesimen

manusia dengan urutan nukleotida yang lengkap. Seleksi isolat HMPV difokuskan pada isolat yang berasal dari negara Tiongkok dan Australia karena termasuk ke dalam empat negara dengan kunjungan wisatawan terbanyak di Indonesia selama lima tahun terakhir.

Hasil penelusuran menunjukkan terdapat 10 data genom HMPV yang berasal dari Indonesia, dua diantaranya adalah gen yang mengode protein F dan delapan diantaranya adalah gen yang mengode protein M. Seluruh data tersebut masih tergolong data dengan urutan nukleotida dan protein parsial sehingga tidak dapat dijadikan kandidat dalam proses seleksi epitop. Oleh karena itu, dilakukan *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) untuk menguji dan memilih isolat HMPV dari negara Tiongkok dan Australia yang memiliki homologi atau kemiripan urutan nukleotida (Altschul dkk., 1990; Arora & Malik, 2021) dengan isolat yang berasal dari Indonesia. Menurut studi, HMPV dari subgrup (A1 dan A2; B1 dan B2) yang sama memiliki kemiripan sebesar 94 – 96% berdasarkan hasil BLAST urutan nukleotida gen F dan 97 – 99% berdasarkan hasil pengujian menggunakan urutan asam amino protein F (López-Huertas dkk., 2005).

3.4.2 Analisis Alel HLA Dominan di Indonesia

Analisis frekuensi jenis alel HLA pada populasi Indonesia dilakukan melalui *web server* The Allele Frequency Net Database (AFND) (<http://www.allelefrequencies.net>). Data-data yang digunakan pada *web server* AFND diperoleh dari empat sumber, yaitu publikasi yang kualitasnya sudah dievaluasi oleh para ahli, data yang telah dianalisis oleh International HLA and Immunogenetics Workshops (IHWs), data yang diajukan oleh laboratorium dari berbagai negara, dan laporan publikasi singkat yang berkolaborasi dengan jurnal Human Immunology (Gonzalez-Galarza dkk., 2020).

3.4.3 Prediksi Epitop CTL (MHC I/CD8+) dan HTL (MHC II/CD4+)

Prediksi epitope CTL dilakukan melalui *web server* NETMHCpan-4.1 (<https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?NetMHCpan-4.1>) (Reynisson dkk., 2021). *Web server* tersebut membantu memprediksi epitop CTL dengan 9 urutan asam amino yang dapat berikatan kuat dengan alel manusia (HLA). Jenis alel yang digunakan untuk memprediksi epitop CTL yaitu HLA *Supertype Representative*, yaitu jenis HLA yang memiliki karakteristik pengikatan peptida yang mirip sehingga jika peptida atau epitop terikat pada satu alel HLA supertipe maka peptida tersebut dapat berikatan dengan jenis alel lain pada supertipe yang sama (M. Wang & Claesson, 2014). Ambang batas yang menyatakan kekuatan ikatan epitop dengan HLA disesuaikan dengan pengaturan bawaan. Epitop yang berikatan kuat dengan HLA dikategorikan sebagai *strong binder* $\leq 0,5$ (% peringkat persentil) sedangkan *weak binder* memiliki peringkat persentil $\leq 2\%$ (Reynisson dkk., 2021).

Prediksi epitop HTL dilakukan melalui *web server* Immune Epitope Database & Tools (IEDB (<https://www.iedb.org/>)) dengan model prediksi NetMHCIIpan 4.1 EL serta panjang pergeseran (*shift length*) 3 dan 5. Jenis alel HLA yang digunakan dalam memprediksi epitop HTL yaitu 27 jenis alel HLA yang mencakup 97% populasi manusia (Reynisson dkk., 2021; Yan dkk., 2024). Mayoritas epitop HTL memiliki panjang 13-25 asam amino (Sun dkk., 2021) dengan panjang rata-rata 15 asam amino (Painter & Stern, 2012; Song dkk., 2023). Selain itu, suatu studi menyatakan bahwa panjang epitop HTL yang optimal adalah 18-20 asam amino. Semakin panjang epitop, dalam rentang 18-20 asam amino, maka semakin tinggi afinitasnya terhadap molekul MHC II (O'Brien dkk., 2008). Oleh karena itu, prediksi epitop HTL dibatasi dengan panjang 15-20 asam amino. Ambang batas yang menyatakan kekuatan ikatan

ditetapkan adalah $\leq 2\%$ (% peringkat persentil) untuk kategori *strong binder* dan $\leq 10\%$ (% peringkat) untuk kategori *weak binder*, kemudian dipilih epitop dengan status *strong binder* (Rizarullah dkk., 2024). Menurut studi, NetMHCIIpan memiliki akurasi yang baik dalam memprediksi epitop sel T (Maleki dkk., 2022).

NetMHCpan 4.1 dan NetMHCpanII 4.0 menggunakan data hasil eksperimen sebagai *training data*, yaitu *binding affinity* (BA) atau afinitas ikatan dan *eluted ligands* (EL) atau elusi ligan yang diperoleh menggunakan spektroskopi massa (Reynisson dkk., 2021). Spektroskopi massa dapat digunakan untuk mengidentifikasi urutan asam amino dari peptida yang terikat pada suatu jenis MHC (Purcell dkk., 2019). Tahap awal pengujian menggunakan spektroskopi massa, yaitu isolasi kompleks MHC-peptida menggunakan antibodi (Stopfer dkk., 2021). Selanjutnya, peptida dipisahkan atau dielusi dari MHC, tahapan ini disebut EL (Paul dkk., 2020).

3.4.4 Analisis Tingkat *Conservancy* Epitop

Conservancy Test kandidat epitop CTL dan HTL dilakukan menggunakan *web server* IEDB dengan *tools* Conservation Across Antigen (<http://tools.iedb.org/conservancy/>) (H. H. Bui dkk., 2007; Mortazavi dkk., 2024). Penentuan tingkat *conservancy* epitop dilakukan dengan membandingkan kandidat epitop terhadap protein dari isolat lain. Tingkat *conservancy* dinyatakan sebagai perbandingan sekuens protein yang cocok, dengan epitop yang disejajarkan (*aligned epitope*), dengan total protein dari berbagai isolat yang digunakan (H.-H. Bui dkk., 2007). Pada penelitian ini, protein pembanding diperoleh dari isolat HMPV yang terdapat pada *database* NCBI Virus (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/virus>). Pemilihan isolat HMPV didasarkan pada status isolat yang terverifikasi gen dan proteinnya dan isolat yang teridentifikasi variannya. Selain lintas varian virus HMPV,

pemilihan isolat juga dipilih dari berbagai negara dan tahun isolasi agar analisis tingkat *conservancy* vaksin menjadi representatif.

3.4.5 Analisis Cakupan Populasi

Respon imun. yang muncul saat epitop yang membentuk kompleks dengan MHC (HLA) dikenali oleh sel T, merupakan tanda bahwa MHC pada tubuh individu tersebut dapat berikatan dengan epitop tertentu. MHC (HLA) bersifat sangat polimorf, di mana beberapa variasi genetiknya terjadi pada daerah pengikatan peptida atau epitop sehingga masing-masing jenis MHC memiliki kemampuan berikatan yang beragam terhadap epitop. Frekuensi suatu HLA pada suatu populasi sangat beragam, oleh karena itu dalam merancang suatu vaksin, analisis cakupan populasi model vaksin merupakan tahapan yang sangat berpengaruh terhadap efektivitas vaksin (H. H. Bui dkk., 2006).

Analisis cakupan populasi kandidat epitop dilakukan melalui *web server* Population Coverage (<http://tools.iedb.org/population/>) (H. H. Bui dkk., 2006; Mortazavi dkk., 2024a). *Web server* ini menghitung sejumlah individu yang diprediksi dapat merespon suatu epitop berdasarkan jenis MHC yang diketahui. (Mahapatra dkk., 2020). Terdapat tiga jenis analisis cakupan populasi, yaitu cakupan populasi untuk epitop HLA I, HLA II, dan gabungan. Analisis masing-masing epitop didasarkan pada rata-rata jumlah kombinasi epitop-HLA yang dikenali pada beberapa populasi dan jumlah minimum kombinasi epitop-HLA yang dikenali oleh 90% populasi (PC90) (Mahapatra dkk., 2020).

3.4.6 Evaluasi Kemampuan Induksi Sitokin, Immunogenisitas, dan Keamanan Epitop

Evaluasi sifat imunogenisitas, alergenitas, dan toksisitas kandidat epitop sangat penting dilakukan selama proses pengembangan vaksin multi-epitop untuk memastikan keamanan dan kemampuan vaksin dalam

menimbulkan respon imun yang optimal (Mortazavi dkk., 2024). ToxinPred 3.0 (<https://webs.iitd.edu.in/raghava/toxinpred>) digunakan untuk memprediksi toksisitas kandidat epitop (Mortazavi dkk., 2024a; Rathore dkk., 2024). ToxinPred 3.0 memiliki empat metode prediksi, yaitu SVM (Swiss-Prot), SVM (Swiss-Prot) + Motif, SVM (TrEMBL), dan SVM (TrEMBL) + Motif (Rathore dkk., 2024). Epitop yang dipilih merupakan epitop yang diprediksi non-toksik berdasarkan seluruh metode prediksi.

Selain toksisitas, epitop juga diseleksi melalui sifat alergenitasnya. Alergen merupakan protein atau glikoprotein yang dikenali oleh imunoglobulin E (IgE) dan diproduksi oleh sistem imun pada individu yang memiliki alergi. Protein dikategorikan sebagai alergen jika memiliki urutan peptida yang identik dengan epitop IgE manusia (Tomar & De, 2010). Pengujian alergenitas epitop dilakukan melalui AllerTOPV 2.1 (https://www.ddg-pharmfac.net/allertop_test/) (Dimitrov dkk., 2014; Martinelli, 2022) yang diketahui memiliki sensitivitas sebesar 86,7%, spesifisitas 90,7%, dan akurasi 88,7% (Dimitrov dkk., 2014). Selanjutnya, epitop yang tergolong non-toksik dan non-alergen diuji sifat antigenitasnya, yaitu kemampuan epitop untuk melekat pada reseptor sel T dan B untuk memicu respon imun adaptif (Goodswen dkk., 2023). Pengujian antigenitas dilakukan melalui VaxiJen 3.0 (<https://www.ddg-pharmfac.net/vaxijen3/home/>) (Dimitrov dkk., 2020; Doneva & Dimitrov, 2024; Mortazavi dkk., 2024a; Sotirov & Dimitrov, 2024) yang terbukti memiliki akurasi prediksi hingga 89% (Mahapatra dkk., 2020).

Selain keamanan, kandidat epitop juga diseleksi berdasarkan kemampuannya dalam menginduksi sitokin. Prediksi kemampuan kandidat epitop dalam menginduksi IFN- γ dilakukan melalui IFNepitope (<https://webs.iitd.edu.in/raghava-ifnepitope/>) (Dhanda, Vir, dkk., 2013;

Martinelli, 2022). IFNepitope memiliki akurasi maksimum sebesar 82,10% dalam memprediksi kemampuan induksi IFN- γ (Dhanda, Vir, dkk., 2013). Prediksi dilakukan melalui *web server* IL-4 melalui IL4Pred (<https://webs.iiitd.edu.in/raghava/il4pred/>) (Dhanda, Gupta, dkk., 2013; Mortazavi dkk., 2024a). Metode prediksi *hybrid* antara metode pasangan asam amino dengan analisis motif yang digunakan pada IL4Pred memiliki akurasi maksimum sebesar 75,76% (Dhanda, Gupta, dkk., 2013). Selanjutnya, IL2Pred (<https://webs.iiitd.edu.in/raghava/il2pred/>) digunakan untuk memprediksi kemampuan epitop dalam menginduksi IL-2 (Mehta dkk., 2025).

IFNepitope dan IL4Pred menggunakan pendekatan yang sama, yaitu *Support Vector Machine* (SVM), motif, dan *hybrid* (motif dan SVM). Model prediksi SVM dikembangkan dengan menggunakan beberapa fitur, yaitu komposisi asam amino dan pasangan asam amino. Model prediksi *hybrid* menggabungkan pendekatan SVM dengan motif (Dhanda, Gupta, dkk., 2013; Dhanda, Vir, dkk., 2013). Pendekatan motif memprediksi epitop penginduksi sitokin dengan cara membandingkan sekuens asam amino target dengan epitop yang terbukti kemampuannya dalam menginduksi sitokin (Dhanda, Vir, dkk., 2013). Jika dibandingkan dengan beberapa pendekatan yang digunakan pada kedua *web server* tersebut, pendekatan secara *hybrid* memiliki performa terbaik (Dhanda, Gupta, dkk., 2013; Dhanda, Vir, dkk., 2013). IL2Pred juga menggunakan pendekatan motif melalui *software* MERCI untuk memprediksi kemampuan epitop dalam menginduksi IL-2. Hasil analisis menunjukkan bahwa metode *hybrid*, antara Extra Tree dengan motif, memiliki performa paling baik di antara metode prediksi lainnya (Mehta dkk., 2025). Oleh karena itu, metode *hybrid* digunakan untuk memprediksi kemampuan kandidat epitop dari protein HMPV dalam menginduksi sitokin.

3.4.7 Analisis Interaksi Epitop dengan HLA Dominan Indonesia

Untuk menganalisis interaksi antara kandidat epitop dengan HLA, dilakukan *molecular docking*. Analisis dimulai dari memprediksi struktur 3D dari peptida menggunakan PEP-FOLD 4 (<https://bioserv.rpbs.univ-paris-diderot.fr/services/PEP-FOLD4>). Epitop yang memiliki energi paling rendah artinya memiliki struktur yang paling stabil sehingga dipilih untuk analisis lebih lanjut. Struktur 3D HLA kelas I dan II diperoleh dari Protein Data Bank (PDB) (<https://www.rcsb.org/>). Selanjutnya, dilakukan *molecular docking* serta analisis interaksi antara HLA dengan epitop menggunakan *web server* ClusPro 2.0 (<https://cluspro.bu.edu/login.php>). Kemudian dipilih model interaksi HLA dengan epitop yang terbaik dan dievaluasi menggunakan PRODIGY (<https://rascar.science.uu.nl/prodigy/>). *Web server* PRODIGY berfungsi untuk menganalisis afinitas ikatan antara epitop dengan HLA (Evangelista dkk., 2023a).

3.4.8 Konstruksi Vaksin Multi-Epitop HMPV

Pada konstruksi vaksin multi-epitop, masing-masing epitop CTL dan HTL dihubungkan satu sama lain dengan bantuan *linker* untuk membentuk konjugasi epitop yang efektif serta mendukung aktivitas imunologi dari masing-masing epitop (Tan dkk., 2023). *Linker* juga berfungsi dalam membantu interaksi antar domain protein dan pelipatan protein (*folding*) (D. K. Patel dkk., 2022). Jenis *linker* yang digunakan untuk menghubungkan epitop CTL merupakan AAY, sementara epitop HTL dihubungkan oleh *linker* GPGPG merupakan *spacer* universal yang didesain dan didemonstrasikan oleh Livingston dkk. (2002). Selain itu, adjuvan juga ditambahkan ke dalam konstruksi vaksin untuk meningkatkan imunogenitas vaksin. Adjuvan yang ditambahkan yaitu β -defensin 3 dan PADRE kemudian adjuvan dan epitop dihubungkan dengan *linker* EAAAK. Sekuens *linker* dan adjuvan diperoleh dalam

bentuk FASTA dari basis data NCBI dan Uniprot (<https://www.uniprot.org/>).

3.4.9 Evaluasi Fisikokimia dan Stabilitas Vaksin

Analisis sifat fisikokimia setiap konstruksi vaksin meliputi kelarutan yang diuji melalui Protein-Sol (<https://protein-sol.manchester.ac.uk>), rumus molekul, jumlah asam amino, berat molekul, titik isoelektrik (pI), estimasi waktu paruh di beberapa jenis inang, indeks instabilitas protein, indeks alifatik, dan *grand average hydropathicity* (GRAVY) melalui *web server* Expasy ProtParam (<https://web.expasy.org/protparam/>). Berdasarkan *web server* Protein-Sol, data eksperimen yang digunakan untuk memprediksi kelarutan protein memiliki rata-rata populasi 0.45 sehingga protein uji dinyatakan memiliki kelarutan yang lebih tinggi dibandingkan rata-rata protein *E. coli* yang larut dalam air jika nilainya lebih dari 0.45 (Niwa dkk., 2009). GRAVY merupakan nilai rata-rata indeks *hydropathy*, yaitu nilai yang sifat hidrofilisitas atau hidrofobisitas suatu protein berdasarkan rantai samping residu asam *amino* (Kyte & Doolittle, 1982). Protein dengan nilai GRAVY negatif menandakan bahwa protein tersebut bersifat hidrofilik (H. Wang dkk., 2021).

Indeks alifatik adalah volume relatif suatu protein yang ditempati oleh rantai samping alifatik (alanin, valin, isoleusin, dan leusin) (Ikai, 1980). Indeks alifatik berkaitan dengan stabilitas termal suatu protein, semakin tinggi indeks alifatik maka stabilitas termal suatu protein semakin tinggi (Panda & Chandra, 2012). Indeks instabilitas mengestimasi stabilitas suatu protein atau peptida (Guruprasad dkk., 1990; Osorio dkk., 2015). Prediksi indeks instabilitas protein didasarkan pada komposisi asam amino. Protein atau peptida dengan indeks instabilitas kurang dari 40 dinyatakan stabil, sementara indeks instabilitas di atas 40 tergolong ke dalam protein atau peptida yang tidak stabil (H. Wang dkk., 2021). Titik isoelektrik (pI) adalah pH saat muatan

total suatu protein sama dengan nol. Protein memiliki muatan positif pada kondisi pH di bawah pI dan bermuatan negatif pada kondisi pH di atas pI. Protein dapat bersifat sangat asam atau basa dengan rentang nilai pI 4.0 sampai 12.0. Dalam proses pengembangan vaksin, nilai pI sangat berguna untuk menentukan metode isolasi, pemisahan, dan purifikasi protein (Tokmakov dkk., 2021a).

3.4.10 Prediksi dan Validasi Struktur Vaksin

Struktur tersier vaksin diprediksi menggunakan *web server* AlphaFold (<https://alphafoldserver.com>) (Abramson dkk., 2024; Mortazavi dkk., 2024). Struktur tersier kemudian diperbaiki dan disempurnakan melalui *web server* GalaxyRefine2 (<https://galaxy.seoklab.org/cgi-bin/>) (Heo dkk., 2013). Validasi struktur tersier vaksin dilakukan berdasarkan plot Ramachandran melalui SAVES 6.1 – PROCHECK (<https://saves.mbi.ucla.edu>). Plot Ramachandran dapat memastikan validitas struktur *backbone* protein berdasarkan pada dua variabel, yaitu sudut torsi φ (ikatan antara N dengan C_{α}) dengan sudut ψ (ikatan antara C dengan C_{α}) (R. A. Laskowski dkk., 1993; RomanA. Laskowski dkk., 1996; Park dkk., 2023). Kedua jenis torsi tersebut menentukan konformasi atau pelipatan dari *backbone* protein (Joosten & Lütteke, 2017). Struktur tersier dengan kualitas tinggi memiliki lebih dari 90% residu yang berada pada daerah yang diperbolehkan (*favorable region*) pada plot Ramachandran (Al-Khayyat & Al-Dabbagh, 2016).

3.4.11 Prediksi Epitop Sel B

Dalam desain vaksin multi-epitop, epitop sel B umumnya ditambahkan ke dalam konstruksi vaksin, namun BCR pada sel B dapat mengenali epitop langsung tanpa harus diproses oleh *antigen presenting cell* (APC) (Zhou dkk., 2021). Epitop sel B dapat berupa urutan asam amino linear atau diskontinu, yang berinteraksi satu sama lain, dan epitop kontinu yang membentuk konformasi struktur 3D (F. Liu dkk., 2024). Menurut

studi, epitop yang dikenali oleh sel B didominasi oleh epitop 3D. Oleh karena itu, pada penelitian ini epitop sel B tidak ditambahkan ke dalam konstruksi vaksin, tetapi dilakukan pengujian kemampuan vaksin (struktur 3D) untuk dikenali oleh BCR pada sel B melalui *web server* IEDB dengan *tool* ElliPro (<http://tools.iedb.org/ellipro/>). ElliPro memiliki akurasi yang lebih baik dalam memprediksi epitop diskontinu sel B (Rizarullah dkk., 2024). ElliPro mengimplementasikan metode Thornton yang memprediksi epitop diskontinu berdasarkan permukaan globular protein serta pengelompokan residu. ElliPro menggunakan tiga jenis algoritma, yaitu penaksiran bentuk protein sebagai *ellipsoid*, perhitungan *protrusion index* (PI) atau indeks protrusi, dan pengelompokan residu yang bersebelahan berdasarkan nilai PI. Nilai PI menyatakan persentase residu yang berada di luar *ellipsoid*. Residu yang memiliki nilai PI di atas batas yang telah ditentukan, dinyatakan sebagai epitop sel B (Ponomarenko dkk., 2008).

3.4.12 *Molecular Docking* Vaksin Multi-Epitop dengan *Toll-Like Receptor*

Molecular docking adalah teknik komputasi untuk memprediksi afinitas ikatan suatu ligan terhadap protein reseptor (Agu dkk., 2023). Uji kelayakan model vaksin yang telah dibuat dilakukan dengan menganalisis kemampuannya dalam dikenali oleh reseptor sel penyaji antigen. Pengujian tersebut dilakukan dengan menganalisis kekuatan dan jenis interaksi antara vaksin dengan *Toll-Like Receptor* (TLR), yaitu bagian dari pola pengenalan (*pattern recognition*) yang dapat mendeteksi infeksi patogen serta mengaktifkan sistem pertahanan pada sel inang (Iwasaki & Medzhitov, 2004). Menurut studi, TLR 2 dan 4 terbukti dapat memicu respon imun antivirus melalui deteksi protein pelapis virus (Tan dkk., 2023).

Struktur tersier TLR diperoleh dari Protein Data Bank (<https://www.rcsb.org/>) kemudian dipreparasi melalui perangkat lunak

PyMOL dengan cara menghilangkan molekul air, lipopolisakarida (LPS), dan ligan lainnya pada TLR (Xiao dkk., 2018). Analisis interaksi antara vaksin dengan TLR 2 (PDB ID: 2Z7X) dan TLR 4 (PDB ID: 3FXI) dilakukan melalui ClusPro 2.0 (Desta dkk., 2020; Jones dkk., 2022; Kozakov dkk., 2013, 2017; Vajda dkk., 2017). ClusPro dinilai memiliki performa dan akurasi *docking* protein-protein yang sangat baik serta dapat memberikan beberapa model ikatan yang merepresentasikan posisi *docking* protein-protein yang mungkin terjadi (Desta dkk., 2020; Martinelli, 2022). Model ikatan dengan energi paling rendah merupakan model yang optimal (Martinelli, 2022) yang kemudian dianalisis kekuatan ikatannya melalui *web server* PRODIGY (<https://rascar.science.uu.nl/prodigy/>) (Vangone & Bonvin, 2015; Xue dkk., 2016).

3.4.13 Simulasi Respon Imun Alel HLA Indonesia terhadap Vaksin Multi-Epitop

Evaluasi kemampuan vaksin multi-epitop HMPV dalam menginduksi respon imun tubuh dilakukan melalui simulasi respon imun menggunakan *web server* C-ImmSim (Rapin dkk., 2010). C-ImmSim dapat memprediksi respon imun adaptif yang terbentuk ketika suatu patogen berinteraksi dengan reseptor (Mortazavi dkk., 2024a; Rapin dkk., 2010). C-ImmSim dapat memprediksi respon imun baik dari jalur limfoid, yaitu CTL, HTL, sel B, dan plasma sel yang memproduksi antibodi, serta jalur myeloid, yaitu makrofag dan sel dendritik (DC) (X. Chen dkk., 2024b; Rapin dkk., 2010). Simulasi respon imun dilakukan pada kedua jenis vaksin yang dikembangkan pada penelitian ini dengan total tiga kali injeksi. Pada C-ImmSim, *simulation step* setara dengan delapan jam pada kehidupan nyata sehingga satu tahun setara dengan 1096 *simulation step* (Evangelista dkk., 2023). Injeksi vaksin diatur tanpa penggunaan adjuvan seperti lipopolisakarida (LPS) untuk memperoleh

data yang objektif terhadap vaksin yang telah didesain (Saleki dkk., 2022). Selain itu, simulasi respon imun difokuskan pada alel HLA dominan Indonesia untuk mengevaluasi efektivitas dan efikasi vaksin yang telah didesain dalam menginduksi respon imun orang Indonesia.

3.4.14 Desain Kloning Ekspresi Vaksin Multi-Epitop secara *In Silico*

Kloning merupakan teknik amplifikasi gen target dengan cara menambahkannya ke dalam vektor, yaitu molekul DNA sirkuler yang berfungsi untuk membantu gen target masuk ke dalam sel inang (Marintcheva, 2018; Rai & Arya, 2021). Kloning secara *in silico* merupakan metode komputasi untuk memprediksi sekuens fragmen DNA, mendesain, dan optimasi proses kloning vaksin (Humayun dkk., 2022). Plasmid merupakan vektor paling sederhana yang memiliki ukuran 1-200 kb (Marín-García, 2014). *E. coli* dipilih sebagai sel inang karena banyak digunakan pada industri bioteknologi, murah, cepat, dan mudah (Hayat dkk., 2018). Pada penelitian ini, plasmid yang digunakan adalah pET yaitu plasmid yang umum digunakan untuk kloning dan ekspresi protein rekombinan pada sel inang *E. coli* (Shilling dkk., 2020). Jenis plasmid pET yang dipilih, yaitu pET-30a(+) karena memiliki sisi pengenalan enzim restriksi NdeI di dekat *ribosom binding site* (RBS).

Vaksin multi-epitop merupakan protein rekombinan sehingga perlu dilakukan translasi balik menjadi sekuens nukleotida (DNA) melalui *web server* EMBOSS *backtranseq* (https://www.ebi.ac.uk/jdispatcher-st/emboss_backtranseq) (Madeira dkk., 2024) dengan sel inang *E. coli* K12. Selanjutnya, sekuens nukleotida yang diperoleh, dioptimasi kodonnya menggunakan *web server* jCat (<https://jcat.de/>) (Grote dkk., 2005; Rizarullah dkk., 2024). Sekuens nukleotida hasil optimasi kemudian ditambahkan primer untuk menyesuaikan pemotongan enzim restriksi NdeI pada ujung 5' (pita atas) dan BamHI pada 3' (pita bawah)

dan disisipkan ke dalam pET-30a(+) menggunakan perangkat lunak SnapGene.

Untuk memudahkan proses purifikasi protein hasil ekspresi, ditambahkan sisi gen pengenalan enzim enterokinase dan gen pengode polihistidin-*tag* (6 His-*tag*) pada C-terminal. Penambahan polihistidin-*tag* dapat membantu proses pemisahan protein target dari pengotor menggunakan kromatografi afinitas-logam (Skiba dkk., 2018a) karena asam amino histidin dapat berikatan kuat dengan ion logam, seperti Co^{2+} , Cu^{2+} , Ni^{2+} , Zn^{2+} , Ca^{2+} , dan Fe^{3+} (Eche & Gordon, 2021). Sisi pengenalan enzim enterokinase dapat dipotong dengan penambahan enterokinase agar memisahkan protein target dengan His-*tag*, sehingga dapat diperoleh target protein yang murni (Nanjundaiah dkk., 2021).