

**KLONING GEN S (HBsAg) DARI ANTIGEN VIRUS HEPATITIS B
DENGAN PENAMBAHAN SINYAL PEPTIDA RETIKULUM
ENDOPLASMA KEDELAI (VSP α S)**

SKRIPSI

**Diajukan untuk Memenuhi Sebagian dari
Syarat untuk Memperoleh Gelar Sarjana Sains
Jurusan Pendidikan Biologi**



Oleh

APSARI SUPRABA

033393

**JURUSAN PENDIDIKAN BIOLOGI
FAKULTAS PENDIDIKAN MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS PENDIDIKAN INDONESIA**

2008

LEMBAR PENGESAHAN

**KLONING GEN S (HBsAg) DARI ANTIGEN PERMUKAAN VIRUS
HEPATITIS B DENGAN PENAMBAHAN SINYAL PEPTIDA
RETIKULUM ENDOPLASMA KEDELAI (VSP α S)**

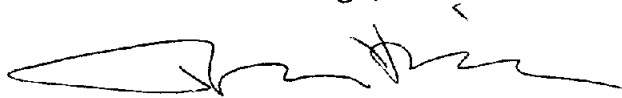
Disusun Oleh :

APSARI SUPRABA

033393

Disetujui dan disahkan oleh :

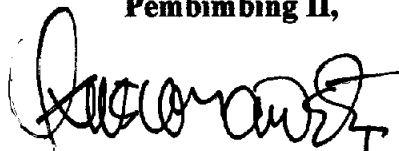
Pembimbing I,



Dr. Topik Hidayat, M.Si.

NIP. 132 169 279

Pembimbing II,



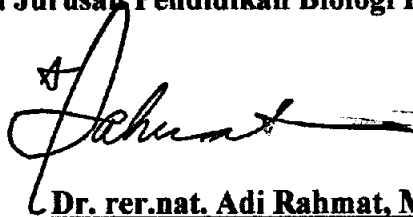
Hj. Diah Kusumawaty, M.Si.

NIP. 132 297 043



Mengetahui,

Ketua Jurusan Pendidikan Biologi FPMIPA UPI



Dr. rer.nat. Adi Rahmat, M.Si.

NIP. 131 975 879

Jadilah mereka yang selalu optimis memandang hidup..

..yang selalu memenuhi hari-hari dengan rasa bahagia..

Jadilah mereka yang tak pernah lelah..

...menyusun dan mencipta istana-istana di pinggir pantai..

[Irfan T.H.]

-Sebuah Karya Untuk Bunda..-



PERNYATAAN

“Saya menyatakan bahwa skripsi yang berjudul **“Kloning Gen S (HBsAg) dari Antigen Virus Hepatitis B dengan Penambahan Sinyal Peptida Retikulum Endoplasma Kedelai (VSP α S)”** adalah sepenuhnya karya saya sendiri yang disusun berdasarkan hasil penelitian saya sendiri. Tidak ada di dalamnya yang merupakan plagiat dari karya orang lain dan saya tidak melakukan penjiplakan atau pengutipan dengan cara-cara yang tidak sesuai dengan etika keilmuan yang berlaku di masyarakat keilmuan. Saya siap menerima sanksi yang dijatuhkan kepada saya apabila kemudian ditemukan adanya pelanggaran terhadap etika keilmuan dalam karya saya ini, atau ada klaim dari pihak lain terhadap keaslian karya saya ini.”

Bandung, Februari 2008

Yang membuat pernyataan,

Apsari Supraba



**KLONING GEN S (HBsAg) DARI ANTIGEN VIRUS HEPATITIS B
DENGAN PENAMBAHAN SINYAL PEPTIDA RETIKULUM
ENDOPLASMA KEDELAI (VSP α S)**

ABSTRAK

Gen S atau hepatitis B *surface antigen* (HBsAg) merupakan antigen permukaan virus hepatitis B yang dapat menginduksi respon imun sehingga dapat digunakan dalam pembuatan vaksin hepatitis B. Penelitian tentang produksi HBsAg rekombinan pada tanaman dalam aplikasinya sebagai vaksin edibel telah banyak dilakukan, namun akumulasi HBsAg dalam jaringan tanaman masih relatif rendah. Sinyal peptida retikulum endoplasma (VSP α S) yang berasal dari gen *vspA* kedelai telah terbukti dapat meningkatkan akumulasi HBsAg dalam jaringan tanaman tembakau. Penelitian ini bertujuan untuk membuat konstruksi fusi gen HBsAg dengan VSP α S. Genom virus hepatitis B yang diisolasi dari serum penderita hepatitis B yang berasal dari Rumah Sakit Hasan Sadikin Bandung digunakan sebagai *template* untuk mengamplifikasi HBsAg dengan teknik *polymerase chain reaction* (PCR). Hasil PCR diligasikan ke dalam vektor pGEM α -T Easy lalu ditransformasikan ke dalam sel *Escherichia coli* strain DH5 α . Plasmid rekombinan pGHB (pGEM α -T Easy-HBsAg) kemudian dijadikan *template* untuk mengamplifikasi fusi HBsAg-VSP α S. Hasil sekuensing pGHB menunjukkan bahwa HBsAg diisolasi dari virus hepatitis B bergenotipe B, subtipe *adw2*. Sedangkan hasil sekuensing konstruksi fusi gen HBsAg dengan VSP α S (pGHBS) diduga telah mengandung urutan VSP α S namun masih perlu dilakukan sekuensing ulang untuk memastikannya.

Kata kunci : Virus hepatitis B, HBsAg, VSP α S, vaksin edibel.



KATA PENGANTAR

Alhamdulillahirobbil'alamin, puji syukur hanya untuk Allah SWT yang telah senantiasa memberikan rahmat, kekuatan dan kasih sayang-Nya kepada penulis sehingga skripsi yang berjudul “**Kloning Gen S (HBsAg) dari Antigen Virus Hepatitis B dengan Penambahan Sinyal Peptida Retikulum Endoplasma Kedelai (VSP α S)**” telah dapat penulis selesaikan. Skripsi ini merupakan salah satu syarat untuk memperoleh gelar Sarjana pada Program Studi Biologi Jurusan Pendidikan Biologi Fakultas Pendidikan Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Pendidikan Indonesia.

Pada kesempatan ini penulis bermaksud menyampaikan ucapan terima kasih yang sebesar-besarnya atas bantuan dan dukungan semua pihak dalam penyelesaian skripsi ini, kepada:

1. Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia (LIPI) yang telah mendanai penelitian yang telah dilakukan oleh penulis.
2. Bapak Dr. Topik Hidayat selaku dosen pembimbing atas bimbingan, nasehat, motivasi dan semangat yang telah diberikan kepada penulis selama pelaksanaan penelitian dan penulisan skripsi.
3. Ibu Diah Kusumawaty, M.Si. selaku dosen pembimbing atas bimbingan, nasehat, motivasi dan semangat yang telah diberikan kepada penulis selama pelaksanaan penelitian dan penulisan skripsi.
4. Bapak Dr. Sony Suhandono yang telah membimbing, membantu dan mendukung penulis selama pelaksanaan penelitian dan penulisan skripsi.

5. Dr. Ernawati Giri-Rachman atas bimbingan dan dukungannya, terutama pada saat pembuatan dan presentasi poster dalam acara The 1st International Symposium on Molecular Pathogenesis: “Recent Advances on Molecular Pathogenesis and Applications to Pharmaceutical Product Development” di ITB.
6. Ibu Dr. Amy Estiati dari LIPI atas dukungannya dan Ibu Ida Parwati dari RSHS atas sampel serum penderita hepatitis B yang digunakan dalam penelitian ini.
7. Bapak Dr. Adi Rahmat selaku pembimbing akademik dan Ketua Jurusan Pendidikan Biologi atas pengarahan dan dukungannya kepada penulis.
8. Ibu Dr. Any Fitriani selaku Ketua Program Studi Biologi Jurusan Pendidikan Biologi yang telah memberikan semangat, nasehat dan dukungannya kepada penulis.
9. Seluruh staf dosen Jurusan Pendidikan Biologi FPMIPA UPI yang telah memberikan ilmu yang bermanfaat bagi penulis.
10. Seluruh staf laboran, Pak Deden, Pak Sarna, Pak Kusmayadi, Bu Arsi dan Teh ‘Ncie, serta Bu In selaku staf tata usaha atas bantuannya selama penulis menempuh pendidikan.
11. Kang Ihsan dan Pak Misbah selaku laboran di Lab. Genetika Molekuler, ITB yang selalu direpotkan.
12. Mamah dan Papah (Alm) tercinta atas doa yang tak putus-putus, dukungan, kasih sayang, pengertian, kesabaran, semangat dan nasehatnya. Mudah-mudahan Allah SWT memberikan kesempatan bagiku untuk membalasnya.

13. Kakak dan Teh Nurul atas doa dan dorongan semangatnya kepada penulis.
14. Teh Ima selaku kakak dan teman seperjuangan atas bimbingan, ilmu dan dukungan kepada penulis selama penelitian ini.
15. Teh Indri di Lab. Patologi RSHS yang telah membantu kelancaran isolasi genom virus hepatitis B yang digunakan dalam penelitian ini.
16. Lidya, Didi dan Aaz, Kang Sony, Kang Guntur atas bantuan dan masukannya kepada penulis selama penelitian ini berlangsung.
17. Teh Ian, Teh Listya, Teh Iza, Teh Riyani, Kang Arif, Resna, Sarip, Imoth, Weni, Bagus, Reza, Teh Latri, Teh Novi, Teh Onad, Teh Nisa, Putri, Geri, Yola dan seluruh rekan-rekan di Lab. Genetika Molekuler, ITB yang tak dapat penulis tuliskan namanya satu per satu, atas bantuan dan kebersamaannya.
18. Siti Ilucan, Mba' Indro dan Resa atas doa, dorongan semangat dan persahabatan yang sangat berharga. Rachma, Novi, Irma dan Nyo-Nyo atas doa, dukungan dan persahabatan selama 4 tahun ini. Amrid atas doa, suplai semangat dan *supportnya*.
19. Seluruh pihak yang terkait yang tak dapat penulis sebutkan satu per satu yang telah membantu hingga selesainya karya tulis ini.

Segala bentuk kritik dan saran yang membangun mengenai karya tulis ini sangat penulis harapkan. Akhir kata, penulis berharap agar karya tulis ini dapat bermanfaat bagi kita semua.

Bandung, Februari 2008

Penulis



DAFTAR ISI

	Halaman
ABSTRAK	i
KATA PENGANTAR.....	ii
DAFTAR ISI.....	v
DAFTAR TABEL.....	x
DAFTAR GAMBAR.....	xi
DAFTAR LAMPIRAN	xiii
BAB I PENDAHULUAN	
A. Latar Belakang.....	1
B. Rumusan Masalah.....	5
C. Batasan Masalah	5
D. Tujuan.....	6
E. Manfaat	6
BAB II KONSTRUKSI PLASMID REKOMBINAN yang DAPAT MENINGKATKAN EKSPRESI HEPATITIS B <i>SURFACE</i> <i>ANTIGEN</i> (HBsAg) pada JARINGAN TANAMAN TRANSGENIK	
A. Virus Hepatitis B	7
1. Klasifikasi.....	7
2. Struktur	7
3. Siklus Hidup	10

4. Subtipe dan Genotipe.....	12
5. Epidemiologi	13
B. Hepatitis B <i>Surface Antigen</i> (HBsAg)	16
C. Vaksin Hepatitis B	17
D. Konstruksi Plasmid Rekombinan HBsAg (rHBsAg) dalam Pengembangan Vaksin Edibel Hepatitis B.....	20
E. Sinyal Peptida Retikulum Endoplasma Kedelai (VSP α S).....	21
F. Teknik-teknik Dasar Biologi Molekuler	23
1. Isolasi DNA	23
2. <i>Polymerase Chain Reaction</i> (PCR)	24
3. Elektroforesis DNA	24
5. Kloning Gen	25
a. Ligasi	25
b. Transformasi	25
c. Isolasi DNA Plasmid	27
4. Analisis Restriksi	29

BAB III METODE PENELITIAN

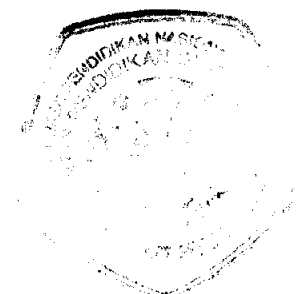
A. Jenis Penelitian.....	30
B. Populasi dan Sampel.....	30
C. Waktu dan Tempat Penelitian	30

E. Metode Kerja	34
1. Pembuatan Konstruksi pGHB (pGEM-T® Easy vector -HBsAg)	36
a. Isolasi DNA Virus Hepatitis B	36
b. Amplifikasi Gen S (HBsAg)	37
c. Pemurnian Gen HBsAg Hasil PCR	40
d. Ligasi Fragmen HBsAg ke dalam Vektor pGEM-T® Easy	42
e. Transformasi pGHB ke dalam <i>E. coli</i> Strain <i>DH5α</i> ...	43
f. Isolasi DNA Plasmid pGHB	45
g. Analisis Restriksi Konstruksi pGHB oleh Enzim <i>EcoR</i> I	47
h. Sekuensing Plasmid pGHB	48
2. Pembuatan Konstruksi pGHBS (pGEM-T® Easy vector -HBsAg-VSPαS)	48
a. Amplifikasi Fusi Gen S (HBsAg) dengan Penambahan VSPαS	48
b. Ligasi Fragmen HBsAg +VSPαS ke dalam Vektor pGEM-T® Easy dan Transformasi plasmid pGHBS ke dalam <i>E. coli</i> Strain <i>DH5α</i>	51
c. Analisis Restriksi Konstruksi pGHBS oleh Enzim <i>Nco</i> I dan <i>BstE</i> II	52
d. Sekuensing Plasmid pGHBS	53

BAB IV HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN

A. Hasil Penelitian	55
1. Pembuatan Konstruksi pGHB	55
a. Isolasi DNA Virus Hepatitis B	55
b. Amplifikasi Gen S (HBsAg)	57
c. Kloning HBsAg ke dalam Plasmid pGEM-T® Easy ..	59
d. Isolasi Plasmid dan Analisis Restriksi Konstruk pGHB	60
e. Analisis Hasil Sikuensing.....	63
1) Konstruk pGHB	63
2) Penentuan Subtipe Virus Hepatitis B Berdasarkan Urutan Gen S.....	64
3) Penentuan Genotipe Virus Hepatitis B	65
f. Amplifikasi Gen HBsAg dengan Penambahan VSP α S	68
g. Kloning Fusi Gen HBsAg + VSP α S ke dalam Plasmid pGEM-T® Easy	71
h. Isolasi Plasmid dan Analisis Restriksi Konstruk pGHBS	72
i. Analisis Hasil Sikuensing pGHBS.....	74
B. Pembahasan	77
1. Konstruksi Plasmid pGHB dan pGHBS	77
2. Serum Penderita Hepatitis B	78

3. Pengaruh Penambahan Sinyal Peptida VSPoS pada Ujung 5' HBsAg	79
4. Prospek Vaksin Edibel sebagai Vaksin Utama maupun Vaksin <i>Booster</i>	80
5. Prospek Vaksin Edibel Hepatitis B di Indonesia	81
6. Penanggulangan Mutan Virus Hepatitis B Lolos Vaksin	83
BAB V KESIMPULAN DAN SARAN	
A. Kesimpulan	85
B. Saran.....	85
DAFTAR PUSTAKA	86
LAMPIRAN.....	91
RIWAYAT HIDUP	111





DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
3.1 Alat yang digunakan dalam penelitian.....	31
3.2 Bahan yang digunakan dalam penelitian.....	31
3.3 Profil PCR.....	39
3.4 Komposisi Reaksi PCR gen HBsAg.....	39
3.5 Komposisi reaksi ligasi fragmen gen S (HBsAg) dengan pGEM- T® Easy.....	43
3.6 Komposisi reaksi restriksi oleh enzim <i>EcoR</i> I.....	47
3.7 Komposisi reaksi PCR fusi gen HBsAg + VSP α S.....	50
3.8 Komposisi reaksi ligasi fragmen gen S (HBsAg) + VSP α S dengan vektor pGEM- T® Easy.....	51
3.9 Komposisi reaksi restriksi oleh enzim <i>BstE</i> II.....	53
3.10 Komposisi reaksi restriksi oleh enzim <i>Nco</i> I.....	53
4.1 Spektrofotometri hasil isolasi DNA virus hepatitis B.....	55
4.2 Jumlah koloni putih dan biru hasil transformasi pGHB.....	60
4.3 Jumlah koloni putih dan biru hasil transformasi pGHBS.....	72



DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
2.1 Partikel virus hepatitis B. Partikel <i>Dane</i> (kiri), partikel subviral (kanan).....	8
2.2 Struktur virus hepatitis B	9
2.3 Genom virus hepatitis B.....	9
2.4 Mekanisme replikasi virus hepatitis B	11
2.5 Distribusi geografi infeksi kronis virus hepatitis B.....	14
2.6 <i>Hepatitis B Surface Antigen</i> (HBsAg).	17
2.7 Mekanisme sinyal peptida retikulum endoplasma	22
3.1 Alur penelitian tahap I (pembuatan konstruk pGHB)	34
3.2 Alur penelitian tahap II (pembuatan konstruk pGHBS)	35
3.3 Primer forward (HBsF) dan primer reverse (HBsR) yang digunakan dalam amplifikasi Gen S	38
3.4 Purifikasi produk PCR	41
3.5 pGEM-T® Easy vector	43
3.6 Tahap-tahap transformasi.....	45
3.7 Primer forward (VspA+HB-F) dan primer reverse (HB-R) yang digunakan dalam amplifikasi fusi gen S-VSP α S	49
4.1 Foto negatif hasil elektroforesis isolat DNA virus hepatitis B	56
4.2 Foto negatif hasil amplifikasi gen HBsAg.....	58
4.3 Koloni putih dan koloni biru hasil transformasi pGHB dalam medium LB padat+Ampisilin+IPTG+X-Gal.	60
4.4 Foto negatif hasil isolasi plasmid pGHB dan hasil restriksi pGHB 13 dan 3.....	62
4.5 Foto negatif hasil isolasi plasmid dan hasil restriksi pGHB A, B dan C.....	63
4.6 Jenis-jenis plasmid berdasarkan berat molekulnya	63

4.7 Alogaritma penentuan subtype virus hepatitis B dari struktur primer gen S	65
4.8 Urutan gen HBsAg hasil sikuensing (743 bp).....	67
4.9 Salah satu hasil <i>alignment</i> atau penjajaran antara sekuen HBsAg (<i>Query</i>) dengan sekuen gen S virus hepatitis B subtype <i>adw</i>	68
4.10 Foto negatif hasil amplifikasi gen HBsAg +VSP α S	69
4.11 Koloni putih dan koloni biru hasil transformasi pGHBS dalam medium LB padat+Ampisilin+IPTG+X-Gal.	71
4.12 Foto negatif hasil isolasi plasmid pGHBS (13.a,13.b,13.c).....	73
4.13 Foto negatif hasil restriksi pGHBS13.a dengan enzim <i>BstE</i> II dan <i>Nco</i> I	74
4.14 Hasil <i>pairwise alignment</i> antara primer VspA + HB-F yang mengandung urutan sinyal peptida VSP α S dengan hasil sikuensing plasmid pGHBS menggunakan program Bioedit.....	76
4.15 Salah satu hasil <i>alignment</i> atau penjajaran antara sikuen fusi gen HBsAg + VSP α S (<i>query sequence</i>) pada NCBI menunjukkan homologi sebesar 79% dengan sikuen parsial gen S virus hepatitis B isolat Alaska.....	77



DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Hasil Sikuensing Gen S (HBsAg)	91
2. Hasil Sikuensing Fusi Gen S + VSP α S	100
3. Grafik Hasil Penjajaran HBsAg dengan <i>Data Base</i> NCBI Menggunakan <i>Viral Genotyping Tool</i>	102
4. Hasil BLASTn (<i>nucleotide</i>) HBsAg dengan <i>Data Base</i> NCBI	104
5. Posisi Primer HBsF dan HBsR dalam Urutan Genom Hepatitis B.....	108
6. Komposisi Bahan-bahan	109



DAFTAR PUSTAKA

- Achmadi, U. F. (2002). "The Epidemiology of Communicable Diseases in Indonesia and Its Relation to The Importance of Vaccine Development." One-day Seminar on the occasion of 112th Bio Farma Anniversary.
- Anonim. (2000). Chapter 17: Translation and Signal Sequence [Online]. Tersedia: http://departments.oxy.edu/biology/bio130/lectures_2000/11-1700_lecture.htm [3 Maret 2007]
- Anonim. (2005). Hepatitis B [Online]. Tersedia: http://www.dshs.state.tx.us/idcu/disease/hepatitis/hepatitis_b/faqs/ [2 February 2008]
- Anonim. (2002). DNA Plasmid [Online]. Tersedia: http://biochemistry.yonsei.ac.kr/biochem_molecular/gene_cloning_20.php [2 February 2008]
- Binder, A. (1997). Transformation of Competent DH5alpha Cells [Online]. Tersedia: <http://www.kfunigraz.ac.at/~binder/thesis/node55.html> [23 November 2007]
- Brown, T. A. (2003). *Pengantar Kloning Gen*. Cetakan Kedua. Yogyakarta: Yayasan Essentia Medica.
- Campbell, N. A. (2002). *Biologi*. Erlangga. Jakarta.
- Davis, H. L. (1996). "DNA-based Vaccination against Hepatitis B Virus". *Advanced Drug Delivery Reviews*. 21: 33-47.
- Dienstag, J. L. (2008). Introduction to Chronic Hepatitis B: Diagnosis, Clinical Features, and Natural History [Online]. Tersedia: <http://www.meds.com/hepatitis/casebased/dienstag.html> [6 Februari 2008]
- Djumhana, A. (2007). "Hepatitis B Vaccine: Industrial Perspective". Symposium and Workshop: Molecular Biology of Hepatitis B Virus and Its Importance in Biotechnology Product Development.
- Effendi (2004). Konstruksi Vektor Biner dengan Promoter MeEF1 Berbasis pCAMBIA1390 untuk Ekspresi Gen Hepatitis B Surface Antigen (HBsAg) pada Tumbuhan. Skripsi Sarjana pada Institut Teknologi Bandung: tidak diterbitkan.
- Hamid, A. (2001). *Deoxyribo Nucleac Acid*. Alfabeta. Bandung.

- Huang, Z. & Mason H. S. (2004). "Conformational Analysis of Hepatitis B Surface Antigen Fusions in an Agrobacterium-Mediated Transient Expression System". *Plant Biotechnology Journal*. 2: 242-249.
- Jalali, M. V. & Alavian S. M. (2006). Hepatitis B e Antigen-Negative Chronic Hepatitis B [Online]. Tersedia: <http://hepmon.com/view/?id=95> [6 February 2008]
- Kapusta, J., Modelska, A., Figlerowicz, M., Pniewski, T., Letellier, M., Lisowa, O., Yusibov, V., Koprowski, H., Plucienniczak, A. & Legocki, A. B. (1999). "A Plant-derived Edible Vaccine Against Hepatitis B Virus". *FASEB*. 13: 1796-1779.
- Kumar, S. G. B., Ganapathi, T.R., Bapat, V.A. Revathi, C.J. & Prasad, K.S.N. (2002). "Expression of Hepatitis B Surface Antigen in Transgenic Banana Plants and NT- I Cell Line of Tobacco". *BARC Newsletter*. 85-96.
- Kwak. (2006). PCR Product Purification [Online]. Tersedia: <http://php.chol.com/~kwak0393/tt/tag/PCR> [2 February 2008]
- Learned, J. (2006). Hepatitis B: The Other Hepatitis Virus Prevention, Diagnosis and Treatment of HIV/HBV Co-infection [Online]. Tersedia: <http://www.thebody.com/content/art1081.html> [20 February 2008]
- Ljunggren, K. K., Miyakawa, Y., Kidd A. H. (2002). "Genetic Variability in Hepatitis B Viruses". *Journal of General Virology* . 83: 1267-1280.
- Lu, T & Block, T. (2004). "Study of Early Steps of the Hepatitis B Virus Life Cycle". *International Journal of Medical Sciences*. 1(1):21-33.
- Lou, X. *et al.* (2007). "Expression of the Human Hepatitis B Virus Large Surface Antigen Gene in Transgenic Tomato Plants". *Clinical and Vaccine Immunology*. 14(4): 464-469.
- Mahoney, F. J. & Kane, M. (1999). "Hepatitis B Vaccines". In: Plotkin SA Orenstein WA, eds. "Vaccines", 3rd ed. *W B. Saunders Company*: 158-182.
- Mason, H. S., Lam, D. M-K., & Arntzen, C. J (1992). "Expression of Hepatitis B Surface Antigen in Transgenic Plants". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 98: 11745-11749.
- Muhsinin, S. (2007). Kajian Awal Analisis Amplifikasi DNA Gurame (*Osphronemus gouramy* Lac.) yang Telah Terinfeksi oleh Bakteri *Aeromonas hydrophila* dengan Menggunakan Primer ISSR. Skripsi Universitas Pendidikan Indonesia: tidak diterbitkan.

- Nuraeny, N. (2007). "Hepatitis B Vaccine: Industrial Perspective". Symposium and Workshop: Molecular Biology of Hepatitis B Virus and Its Importance in Biotechnology Product Development.
- Promega. (2007). Promega Protocols and Applications Guide [Online]. Tersedia: <http://www.promega.com/paguide/chap13.htm> [2 February 2008]
- Purdy, M. A. (2007). "Hepatitis B Virus S Gene Escape Mutants". *Asian J Transf Sci.* 1 (2): 62-70.
- Radji, M. (2004). "Pemberian Vaksin Melalui Tanaman Transgenik". *Majalah Ilmu Kefarmasian.* 1(1): 1-9.
- Rathore, M.S. (2004). Transgenic Plants as Edible Vaccines [Online]. Tersedia: <http://www.geocities.com/plantvaccines/transgenicplants.htm> [20 Februari 2008]
- Rhee, Y. & Staswick, P. E. (1992). "Nucleotide Sequence of a Soybean Vegetative Storage Protein vspA Gene". *Plant Physiol.* 98: 792-793.
- Roche. (2005). *High Pure Viral Nucleic Acid Kit.* Roche Applied Science. Philadelphia, USA.
- Salim, L. (2007). "Diagnostik Molekular Virus Hepatitis B". Symposium and Workshop: Molecular Biology of Hepatitis B Virus and Its Importance in Biotechnology Product Development.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. & Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning A Laboratory Manual.* Edisi II. USA: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Shah, R. (2006). Hepatitis B. [Online]. Tersedia: http://www.askdrshah.com/hepatitisB_article.htm [21 Februari 2008]
- Shouval, D. (2003). "Hepatitis B Vaccines". *Journal of Hepatology.* 39: S70-S76.
- Siswono. (2001, 27 September). Desain Vaksin Hepatitis B untuk Indonesia. Kompas [Online]. Tersedia: <http://www.gizi.net/cgi-bin/berita/fullnews.cgi?newsid1001561990,7444>, [11 Februari 2008]
- Sojikul, P., Buehner, N., & Mason, H. S. (2003). "A Plant Signal Peptide-Hepatitis B Surface Antigen Fusion Protein with Enhanced Stability and Immunogenicity expressed in Plant Cells". *PNAS.* 100(5): 2209-2214.
- Soussan, P., Pol, S., Garreau, F., Brechot, C. & Kremsdorf, D. (2001). "Vaccination of Chronic Hepatitis B Virus Carriers with PreS2/S

- Envelope Protein is not Associated with the Emergence of Envelope Escape Mutant". *Journal of General Virology*. 82: 367-371.
- Streatfield, S. J & Howard J. A. (2003). "Plant-based Vaccines". *International Journal for Parasitology*. 33:497-493.
- Sulaiman, A. & Julitasari. (1995). *Virus Hepatitis A sampai E di Indonesia*. Jakarta: Yayasan Penerbitan Ikatan Dokter Indonesia.
- Suryandari, S. (2007). Virus Hepatitis B di Indonesia Memiliki Genotipe B [Online]. Tersedia: <http://www.mcidiaindo.co.id/berita.asp?id=60486> [11 February 2008]
- Thalavana, Y., Huang, Z. & Mason, H. S. (2006). "Plant-derived Vaccines: A Look Back at The Highlights and A View to The Challenges on The Road Ahead". *ISSN*. 5(2): 249-260.
- Theresia, N. (2007). Analisis Mutasi Gen Pengekspresi Domain B dan C DNA Polimerase HBV dari Pasien yang Terinfeksi dengan Titer Rendah. Skripsi Sarjana pada Universitas Kristen Maranatha: tidak diterbitkan.
- Tim Penulis Sinar Harapan. (2002, 9 Oktober). Sekitar 20 Juta Penduduk Idap Virus Hepatitis B [Online]. Sinar Harapan. Tersedia: <http://www.sinarharapan.co.id/berita/0210/09/nas02.html> [20 Februari 2008]
- Tse-Ling, F. (2006). Hepatitis B Virus [Online]. Tersedia: http://www.medicinenet.com/hepatitis_b/article.htm [4 Februari 2008]
- Turner, P. C., McLennan, A. G., Bates, A.D., White, M. R.H. (2000). *Molecular Biology*. Second Edition. United States of America: BIOS Scientific Publishers.
- Qin, S., Tang H., Zhao, L., He, F., Lin, Y., Liu, L., He, X. (2003). "Cloning of HBsAg-Encoded Genes in Different Vectors and Their Expression in Eukaryotic Cells". *World Journal of Gastroenterology*. 9(5): 1111-1113
- Wands, J. R. (2004). "Prevention of Hepatocellular Carcinoma". *Massachusetts Medical Society*. 1567-1570.
- World Health Organization. (2002). "Hepatitis B". *World Health Organization*. WHO/CDS/CSR/LYO/2002 2: Hepatitis B.
- Worman, H. J. (2002). Hepatitis B [Online]. Tersedia: <http://cpmcnet.columbia.edu/dept/gi/hepB.html> [11 Maret 2007]

- Youm, J-W., Won, Y-S., Jeon, J. H., Ryu, C. J., Choi, Y-K., Kim, H-C., Kim, B-D., Joung, Kim, H. S. (2006). "Oral Immunogenicity of Potato-derived HBsAg Middle Protein in BALB/c Mice". *Vaccine*. 25:577-584.
- Yuwono, T. (2006). *Teori dan Aplikasi Polymerase Chain Reaction*. Yogyakarta: Penerbit ANDI.
- Zainuddin, I. M. (2008). Kloning dan Konstruksi HBsAg ke dalam Vektor Ekspresi Tumbuhan dengan Promoter Terinduksi Luka. Tesis Magister pada Institut Teknologi Bandung: tidak diterbitkan.

