

PENGEMBANGAN MARKER MULTIEPITOP UNTUK KIT DIAGNOSTIK HPV E6 BERBASIS LATERAL FLOW ASSAY MELALUI PENDEKATAN IN SILICO

Nadifah Hasna¹, Sabrina Rizki Febriyanti², Taniani Alginta³, Shafira Syifa Aprilia⁴, Ghaisani Fitri Sajidah⁵, Salsabila⁶, Asep Iin Nur Indra⁷

^{1,2,3,4,5,6,7} Politeknik Kesehatan Kementerian Kesehatan Bandung, Bandung, Indonesia
Jl. Pajajaran No.56, Pasir Kaliki, Kec. Cicendo, Kota Bandung, Jawa Barat 40171
Email : nadifahhasnaa@gmail.com

ABSTRAK

Latar belakang: Kanker serviks merupakan kanker kedua terbanyak setelah kanker payudara dan memiliki angka mortalitas yang tinggi dari seluruh kematian akibat kanker. Kanker serviks terbukti disebabkan oleh infeksi terus menerus dari Human papillomavirus (HPV) tipe onkogenik yaitu tipe HPV risiko tinggi diantaranya tipe 31, 33, 35, dan 58. Pada siklus hidup HPV, protein E6 berperan krusial dalam mengatur fungsi-fungsi seluler yang berkontribusi terhadap transformasi sel menjadi kanker. Protein E6 dari tipe HPV berfungsi sebagai onkoprotein utama yang berperan pada proses immortalisasi dan keganasan sel. Secara mekanisme protein E6 dari HPV dengan resiko tinggi berkontribusi pada inaktivasi protein penekan tumor p53. **Tujuan :** Penelitian ini bertujuan untuk mengembangkan marker multiepitop berbasis protein E6 sebagai komponen utama dalam kit diagnosis Lateral Flow Assay (LFA). **Metode :** metode pendekatan bioinformatika untuk mengidentifikasi epitop sel B imunogenik dan konservatif pada protein E6 HPV yang kemudian dilakukan *cloning in silico* dalam plasmid pET-28a(+), sehingga dapat menghasilkan kit diagnostik yang spesifik terhadap deteksi Human papillomavirus (HPV). **Hasil :** Hasil penelitian menunjukkan bahwa marker multiepitop yang dirancang memiliki kemampuan untuk memicu respons imun yang efektif terhadap sel B dan memiliki interaksi yang cukup kuat antara antigen dan antibodi. Studi ini juga menunjukkan kemampuan protein E6 untuk diekspresikan pada plasmid pET-28a(+). **Kesimpulan :** Studi ini memberikan dasar yang kuat untuk pengembangan dan evaluasi lebih lanjut dalam studi *in vivo* untuk pengembangan kit diagnostik skrining berbasis *lateral flow assay* (LFA) dengan memanfaatkan teknologi DNA Rekombinan.

Kata Kunci : Human papillomavirus, Protein E6, Kit diagnostik, In silico

ABSTRACT

Background : Cervical cancer is the second most common cancer after breast cancer and has a high mortality rate from all cancer deaths. Cervical cancer has been proven to be caused by continuous infection of oncogenic types of Human papillomavirus (HPV), namely high-risk HPV types including types 31, 33, 35, and 58. In the HPV life cycle, the E6 protein plays a crucial role in regulating cellular functions that contribute to cell transformation into cancer. The E6 protein from HPV types functions as the main oncoprotein that plays a role in the process of immortalization and cell malignancy. Mechanistically, the E6 protein from high-risk HPV contributes to the inactivation of the p53 tumor suppressor protein. **Objective :** This study aims to develop a multiepitope marker based on the E6 protein as the main component in the Lateral Flow Assay (LFA). **Method :** diagnostic kit with a bioinformatics approach method to identify immunogenic and conservative B cell epitopes in the HPV E6 protein which are then cloned in silico in the pET-28a (+) plasmid, so that it can produce a diagnostic kit that is specific for detecting Human papillomavirus (HPV). **Result :** The results showed that the designed multiepitope marker has the ability to trigger an effective immune response against B cells and has a fairly strong interaction between antigen and antibody. This study also showed the ability of the E6 protein to be expressed on the pET-28a(+) plasmid. **Conclusion :** This study provides a strong basis for further development and evaluation in vivo studies for the development of lateral flow assay (LFA)-based screening diagnostic kits utilizing Recombinant DNA technology.

Keywords: Human papillomavirus, E6 Protein, Diagnostic kit, In silico



PENDAHULUAN

Kanker serviks merupakan salah satu penyakit yang menjadi perhatian utama dalam bidang kesehatan, khususnya kesehatan reproduksi wanita. Penyakit ini disebabkan oleh Human Papillomavirus (HPV) yang merupakan virus DNA yang menyerang sel epitel di serviks dan dapat menyebabkan perubahan seluler abnormal yang berujung pada kanker.¹ HPV memiliki lebih dari 200 tipe, namun hanya beberapa di antaranya yang dikategorikan sebagai resiko tinggi dalam menyebabkan kanker serviks¹.

Kanker serviks merupakan kanker yang sangat umum terjadi pada wanita di seluruh dunia. Menurut WHO pada tahun 2012, jenis kanker ini menempati urutan pertama dari semua jenis kanker yang terjadi pada wanita. Kasus kanker serviks lebih banyak terjadi di negara berkembang, di mana 85% dari total kasus yang dilaporkan setiap tahunnya berasal.² Kanker serviks menempati urutan keempat sebagai kanker yang paling umum didiagnosis di tahun 2020. Penyakit ini juga menjadi salah satu penyebab utama kematian akibat kanker pada wanita, dengan angka global mencapai lebih dari 600 ribu kasus dan lebih dari 300 ribu kematian.³

Menurut Profil Kesehatan Indonesia tahun 2021, kanker serviks menjadi peringkat kedua setelah kanker payudara (sebanyak 36.633 kasus atau 17,2% dari seluruh kanker pada wanita), dan angka mortalitas yang tinggi sebanyak 21.003 kematian atau 19.1% dari seluruh kematian akibat kanker. Hampir 70% pasien terdeteksi kanker pada stadium lanjut sedangkan untuk memperoleh hasil pengobatan kanker serviks yang baik salah satu faktor utama adalah dengan penemuan kasus pada stadium dini.⁴ Tingginya angka kejadian dan kematian ini menunjukkan bahwa kanker serviks masih menjadi masalah kesehatan yang serius dan membutuhkan perhatian lebih dalam hal pencegahan serta deteksi dini.

Kanker serviks seringkali tidak menunjukkan gejala pada tahap awal, sehingga banyak pasien baru terdiagnosis ketika penyakit sudah mencapai stadium lanjut. Pada tahap ini, peluang keberhasilan pengobatan menjadi lebih kecil dan risiko komplikasi meningkat. Oleh karena itu, deteksi dini sangat penting untuk menurunkan angka kematian akibat kanker serviks.³ Metode skrining yang efektif dapat membantu

mendeteksi perubahan seluler sebelum berkembang menjadi kanker.

Saat ini berbagai metode telah dikembangkan untuk mendeteksi kanker serviks, terutama dalam bidang molekuler yaitu metode berbasis deteksi DNA HPV. Metode ini lebih sensitif dibandingkan metode lainnya karena dapat mendeteksi keberadaan DNA HPV berisiko tinggi dalam sel serviks, bahkan sebelum perubahan seluler terjadi. Namun, deteksi ini tidak selalu dapat menentukan infeksi tersebut akan berkembang menjadi kanker, karena tidak semua infeksi HPV menyebabkan transformasi seluler yang ganas.

Salah satu faktor utama dalam perkembangan kanker serviks adalah ekspresi protein E6 yang diproduksi oleh HPV. Peran utama protein onkoprotein E6 pada sel yang terinfeksi HPV adalah untuk memicu degradasi p53 melalui mekanisme proteasom yang tidak bergantung pada ubiquitin, yang berkontribusi pada perkembangan neoplasia.⁵ Proses ini dilakukan untuk menghindari kematian sel, suatu ciri khas dari sel kanker. E6 berikatan pada wilayah E6AP yang terkonservasi dan membentuk kompleks E6/E6AP/p53, yang menyebabkan degradasi p53 dan memungkinkan sel untuk menghindari kematian.^{5 6}

Dalam kondisi normal, p53 berfungsi sebagai faktor transkripsi yang dapat mendeteksi kerusakan DNA dalam sel. Jika terdapat kerusakan, p53 akan mengaktifkan jalur apoptosis yaitu proses bunuh diri sel yang bertujuan untuk mencegah mutasi berbahaya menyebab dan berkembang menjadi kanker.¹ Namun ketika HPV menginfeksi sel epitel serviks, protein E6 akan berikatan dengan p53 dan menandai protein ini untuk degradasi.⁵ Sel akan kehilangan mekanisme kontrol terhadap siklus sel dan terus mengalami proliferasi tanpa terkendali akibat dari aktivitas telomerase yang meningkat sehingga sel dapat terus membelah tanpa batas yang akhirnya mengarah pada transformasi sel kanker.¹

Dengan kondisi yang telah diuraikan di atas, pengembangan metode diagnostik berbasis deteksi protein E6 sangat penting untuk meningkatkan akurasi skrining dan deteksi dini kanker serviks. Dalam upaya meningkatkan efektivitas deteksi dini kanker serviks, penelitian ini mengusulkan pengembangan marker multiepitop berbasis protein E6 sebagai komponen utama dalam kit diagnosis *Lateral*



Flow Assay (LFA). Kit ini dikembangkan dengan metode pendekatan bioinformatika untuk mengidentifikasi epitop sel B yang bersifat imunogenik dan konservatif pada protein E6 dari HPV berisiko tinggi, seperti HPV tipe 31, 33, 35, dan 58.

Pendekatan bioinformatika digunakan untuk menganalisis dan memilih epitop yang memiliki potensi tinggi dalam merangsang respons imun, memastikan bahwa marker yang dikembangkan memiliki spesifisitas yang optimal terhadap infeksi HPV yang berisiko tinggi menyebabkan kanker serviks. Setelah proses identifikasi, epitop yang telah dipilih akan dikonstruksi menjadi marker multiepitop yang kemudian dilakukan *cloning in silico* dalam plasmid ekspresi pET-28a(+).

Dibandingkan dengan metode deteksi HPV berbasis DNA atau sitologi konvensional, pendekatan ini menawarkan beberapa keunggulan. Pertama, dengan menargetkan protein E6, metode ini secara spesifik mengidentifikasi infeksi HPV yang telah menunjukkan aktivitas onkogenik, bukan hanya keberadaan virus. Kedua, pemanfaatan bioinformatika dalam desain marker memungkinkan optimalisasi dalam pemilihan epitop yang lebih imunogenik dan konservatif, sehingga meningkatkan sensitivitas dan spesifisitas diagnostik.

METODE

Metode yang digunakan adalah analisis bioinformatika dengan deteksi antibodi-antigen melalui docking yang diekspresikan di plasmid pET28a. Protein yang digunakan dalam penelitian ini adalah protein E6 dari HPV (*Human Papillomavirus*) yang diambil datanya dari *website* Uniprot. Antibodi yang digunakan dalam penelitian ini adalah 3v6f yang diambil dari situs RCSB Protein Data Bank.

Referensi basis data protein E6 yang digunakan, yaitu HPV 31/E6 (P17386), HPV 58/E6 (P26555), HPV 35/E6 (P27228), dan HPV 33/E6 (P06427). Kemudian urutan FASTA dari masing-masing *database* diurutkan dengan menggunakan *website* MAFFT, urutan protein yang telah diurutkan dalam format FASTA dimasukkan ke *website* EMBOSS CONS guna menghasilkan urutan konsensus. Konsensus ini merupakan nukleotida-nukleotida yang paling dominan.

Epitop untuk sel B diprediksikan dari urutan konsensus menggunakan *website* IEDB Analysis Resource. Pada tahap ini, urutan konsensus dianalisis dan kemungkinan epitop yang dapat dikenali oleh antibodi diprediksikan. Semakin tinggi skor epitop, maka semakin mudah epitop tersebut dikenali oleh antibodi. Setiap prediksi epitop sel B kemudian diurutkan dengan penambahan linker GSG jika panjang asam amino kurang dari 25 asam amino, dan linker GGSGG jika panjang asam amino lebih dari 25 asam amino. Epitop calon antigen selanjutnya dikonstruksikan, dan struktur tersiernya diprediksikan menggunakan *website* ALPHAFOLD3. Hasil PDB dari ALPHAFOLD3 kemudian diunduh.

File antibodi 3v6f dicari pada *website* RCSB, kemudian dibuka dan dirapikan menggunakan aplikasi Notepad++. Urutan atom dirapikan dan diubah menjadi chain A, dengan penomoran dilakukan sesuai dengan jenis asam aminonya; ketika jenis asam amino berubah, penomoran dilanjutkan ke nomor berikutnya. Setelah semua urutan pada file antibodi 3v6f telah dirapikan, penambatan molekul atau docking dilakukan melalui *website* ClusPro 2.0. File antibodi 3v6f yang telah rapi dimasukkan sebagai reseptor dan file hasil ALPHAFOLD3 dimasukkan sebagai ligan, dengan penetapan pada chain A. Selanjutnya, hasil docking dengan skor docking paling rendah (paling negatif) diunduh.

File hasil docking dirapikan sama seperti tahap sebelumnya. Namun, pada nomor akhir penomoran chain A, diubah menjadi awalan urutan chain B. Hasil docking tersebut kemudian dianalisis untuk memperoleh data ΔG dan KD menggunakan *website* Prodigy, di mana pada *website* tersebut data chain A dimasukkan sebagai interactor 1 dan data chain B dimasukkan sebagai interactor 2.

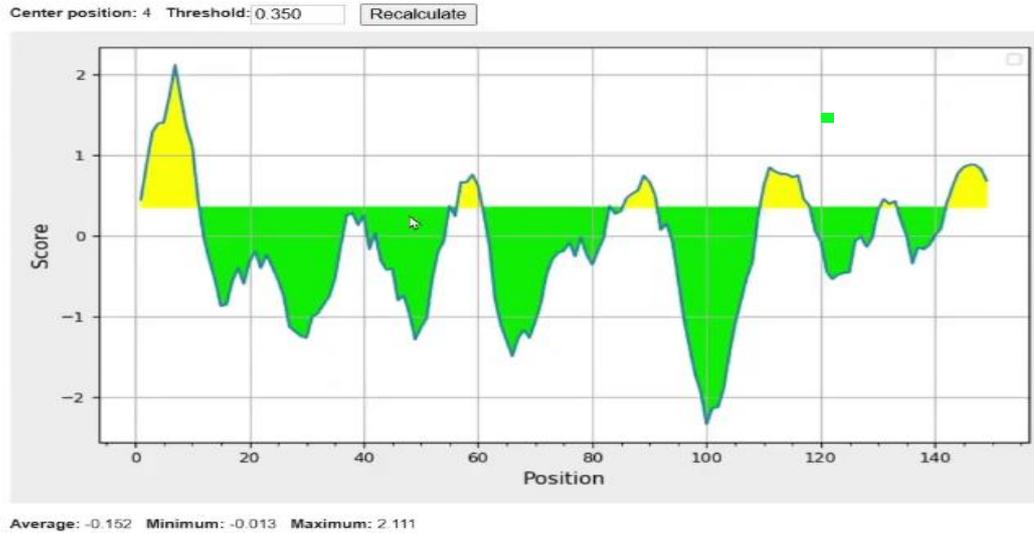
Analisis interaksi yang terbentuk antara keduanya dengan menggunakan *website* PDBsum. Kemudian lakukanlah reverse translasi peptida ke gen menggunakan *website* EMBOSS backtranseq. *Cloning in silico* dilakukan pada aplikasi Snapgene dengan mengekspresikan protein E6 pada plasmid pET-28a(+) di daerah *Multi Cloning Site (MCS)* menggunakan enzim restriksi BamHI dan HindIII.

HASIL

Penelitian ini menghasilkan prediksi

multiepitop pada protein E6 HPV untuk dijadikan kit diagnostik skrining pada kanker serviks. Pengujian sekuen epitop sel B terdapat

pada gambar di bawah ini.



Gambar 1. Hasil uji epitop sel B

Gambar di atas menunjukkan besarnya potensi protein berinteraksi dengan antibodi dengan nilai *threshold* 0.350. Nilai *average* berada di angka -0.152 dan nilai minimum -0.013 serta nilai maksimum sebesar 2.111.

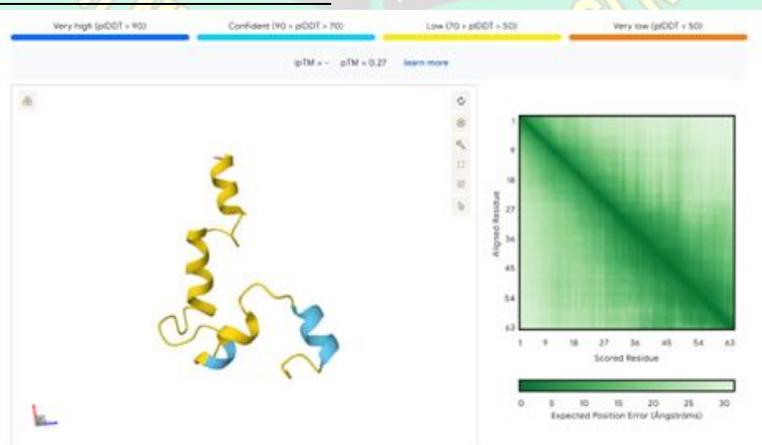
Selanjutnya pengujian terhadap prediksi peptida pada permukaan sel B yang ditunjukkan pada tabel berikut ini:

Tabel 1 Prediksi Peptida pada Sel B

No.	Start	End	Peptide	Length
1	1	11	MFQDPPEEKPR	11
2	55	55	R	1
3	57	60	GNPF	4
4	83	83	V	1
5	86	91	DTLEQT	6
6	110	118	LCPQEKKRH	9
7	131	133	RWT	3

Pada tabel tersebut terdapat tujuh prediksi peptida yang yang dikenali sel B memiliki daerah pengenalan untuk sel B dengan nilai diatas 0.350

Struktur tersier dari protein E6 HPV diidentifikasi secara 3D menggunakan perangkat lunak *AlphaFold3*. Hasil pemeriksaan menunjukkan bahwa struktur protein tersier secara 3D yang didominasi oleh warna kuning dan terdapat sedikit warna biru pada bagian ujung dan tengahnya, hal ini menunjukkan prediksi proteinnya rendah dengan skala skala $50 < pLDDT < 70$, nilai pTM (*predicted Template Modeling score*) sebesar 0.27 dan nilai pIM (*predicted Interface score*) tidak ada.⁷

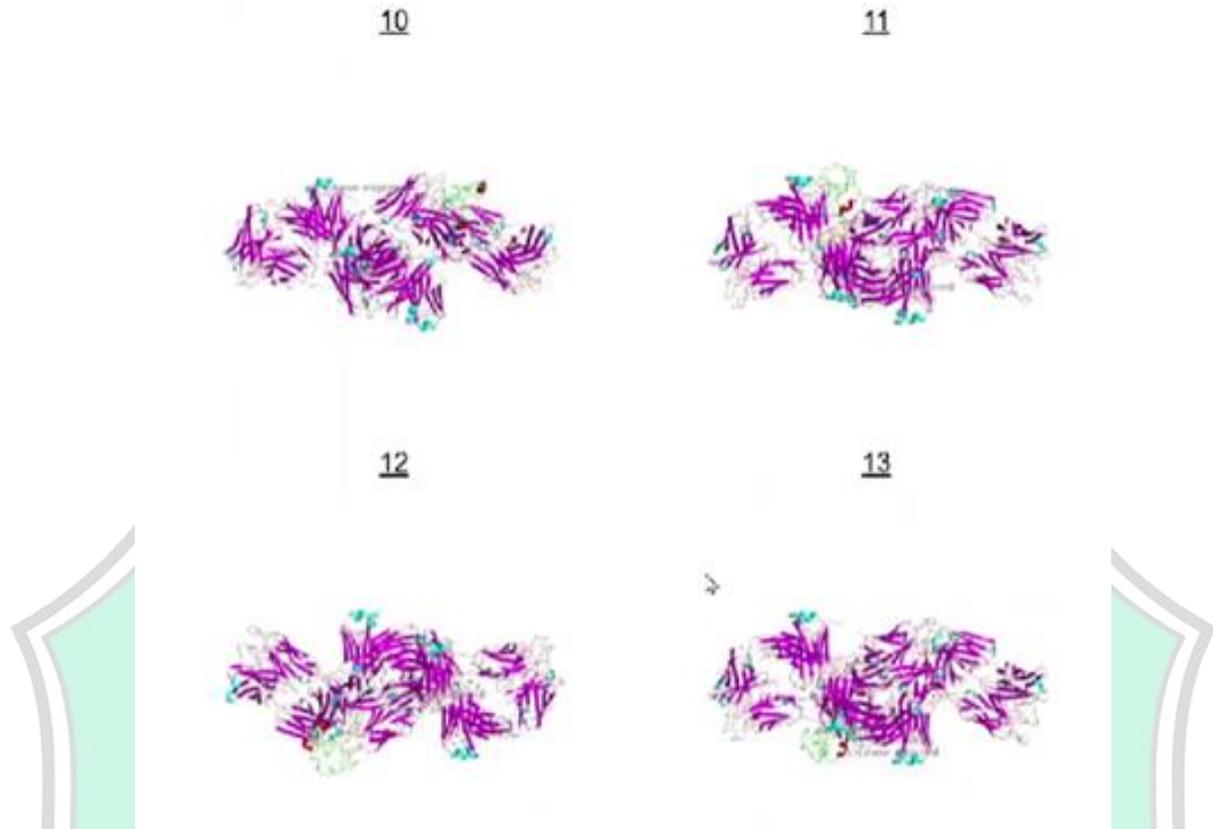


Gambar 2. Hasil prediksi struktur tersier protein

menggunakan *AlphaFold3*

Interaksi antara antigen dan antibodi dievaluasi melalui proses docking. Hasil proses

tersebut dapat dilihat pada gambar 3.



Gambar 3. Hasil docking cluster 12

Gambar di atas menunjukkan skor energi paling rendah dengan nilai -1215.7 Selanjutnya dilakukan analisis energi bebas (ΔG) dan kekuatan interaksi (Kd) menggunakan server Prodigy. Hasil analisis tersebut dapat dilihat pada Gambar 5. nilai ΔG sebesar -18.9 kcal mol⁻¹, nilai Kd sebesar 1.5e-14 M, *charged*-

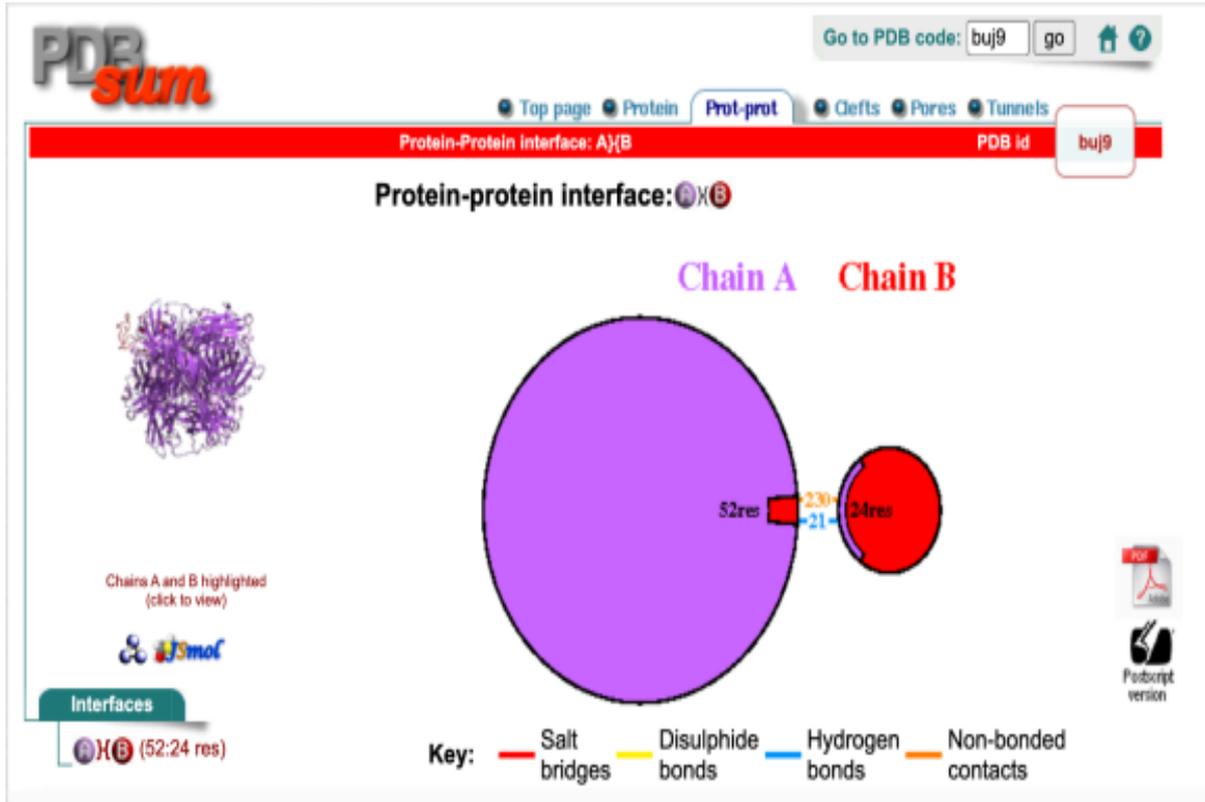
charged sebesar 14, *ICs charged-polar* sebesar 38, *ICs charged-apolar* sebesar 48, *ICs polar-polar* sebesar 10, *ICs polar-apolar* sebesar 33, *ICs apolar-apolar* sebesar 8, NIS *charged* sebesar 19.76, dan terakhir yaitu NIS *apolar* sebesar 32.17.

BINDING AFFINITY AND K_D PREDICTION										
Protein-protein complex	ΔG (kcal mol ⁻¹)	K_D (M) at °C	ICs charged-charged	ICs charged-polar	ICs charged-apolar	ICs polar-polar	ICs polar-apolar	ICs apolar-apolar	NIS charged	NIS apolar
node1_000_12_1_chain_B	-18.9	1.5e-14	14	38	48	10	33	8	19.76	32.17

Gambar 4. Hasil prediksi afinitas pengikatan dan konstanta disosiasi (Kd)

Selain itu, perangkat lunak PDBSum digunakan untuk memetakan interaksi molekuler antar *chain* (A dan B), termasuk jenis interaksi

seperti ikatan hidrogen dan kontak *non-bonded*. Hasil analisis dapat dilihat pada gambar 5.



Interface statistics

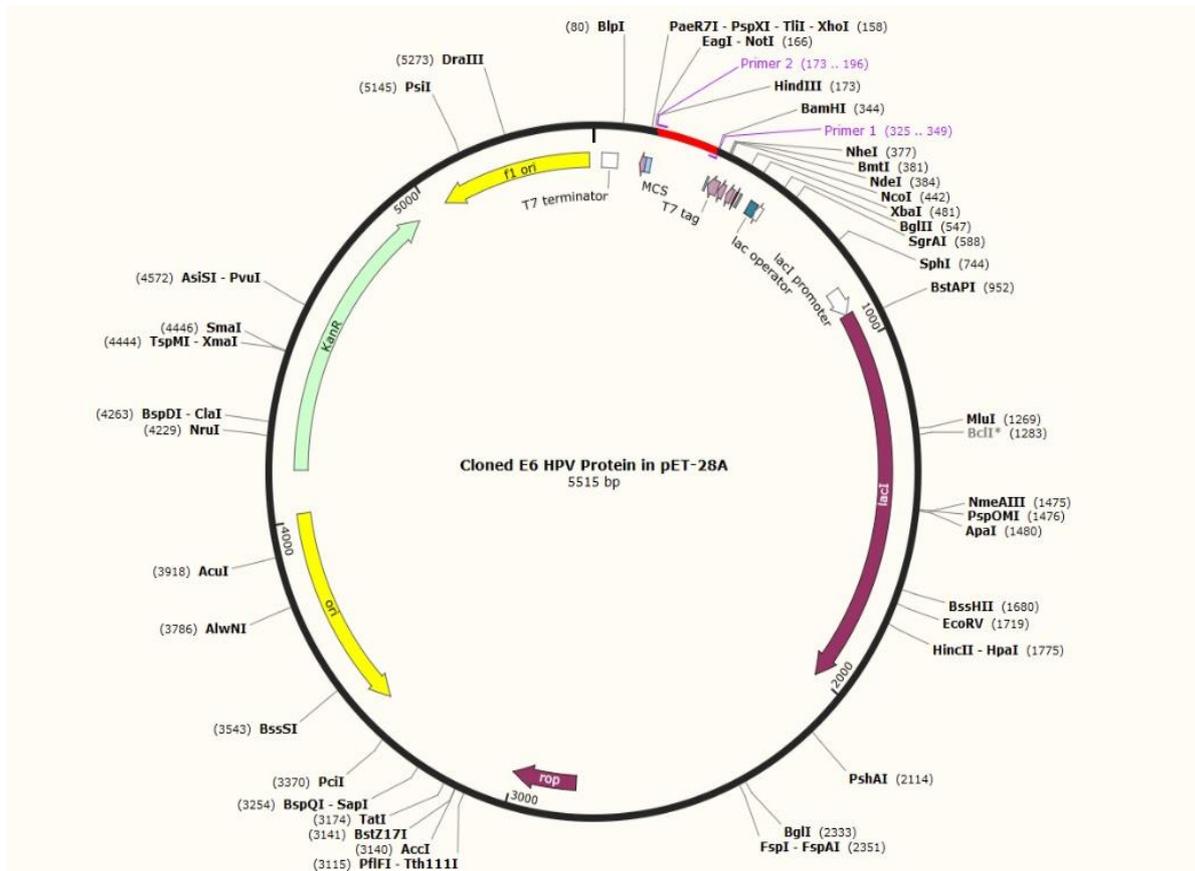
Chain	No. of interface residues	Interface area (Å ²)	No. of salt bridges	No. of disulphide bonds	No. of hydrogen bonds	No. of non-bonded contacts
A	52	1696	-	-	21	230
B	24	1983	-	-	21	230

Gambar 5. Hasil analisis jenis ikatan pada protein

Gambar di atas menunjukkan jumlah ikatan hidrogen yang signifikan (21 ikatan) dan kontak *non-bonded* (230 interaksi), hal ini mengindikasikan hubungan yang kuat antara antigen dan antibodi.

Setelah dilakukan proses *reverse translation* dan *cloning in silico* dengan diterjemahkan kembali ke DNA menggunakan EMBOS *Backtranseq* menjadi urutan basa DNA. Kemudian disisipkan ke dalam plasmid ekspresi

yaitu pET-28a (+) menggunakan perangkat lunak *SnapGene* didapatkan hasil *cloning* yang baik karena DNA target yaitu protein E6 HPV dan plasmid pET-28a dapat berikatan dengan baik. Hasilnya terdapat pada gambar 6. Warna merah pada hasil menunjukkan letak DNA sisipan berada yaitu pada daerah *Multi Cloning Site (MCS)* menggunakan enzim restriksi BamHI dan HindIII.



Gambar 6. Hasil *cloning* protein E6 HPV dan plasmid pET-28a(+)

PEMBAHASAN

Protein E6 merupakan onkoprotein utama HPV yang berperan dalam degradasi p53, menjadikannya biomarker spesifik untuk infeksi HPV berisiko tinggi.² Untuk membuat antigen pada kit diagnostik *Lateral Flow Assay* (LFA), penelitian ini menggunakan protein E6 HPV multiepitop. Deteksi berbasis multiepitop dapat meningkatkan sensitivitas dan spesifisitas dalam mendeteksi respons imun terhadap infeksi HPV.⁸ Menganalisis urutan protein E6 dari berbagai tipe

HPV dan memprediksi struktur protein untuk menyelaraskan urutan protein homolog. Metode prediksi epitop linier yang digunakan yaitu *IEDB Cell Epitope Prediction Tools* yang dilaporkan memiliki tingkat akurasi sekitar 75% ketika diuji menggunakan dataset yang terdiri dari 169 determinan antigenik yang telah diketahui melalui eksperimen.⁹

Pendekatan ini bergantung pada sifat fisikokimia dari residu dan frekuensi kemunculannya dalam epitop yang telah teridentifikasi secara eksperimental. Peptida yang menghasilkan nilai lebih besar atau sama

dengan ambang batas (sekitar 1,05) dianggap sebagai epitop antigenik yang berpotensi.⁹ Sistem kekebalan humoral, yang mengandalkan antibodi, sangat bergantung pada sel B. Oleh karena itu, penting sekali untuk memprediksi bagian-bagian antigen yang dikenali oleh sel B. Selain itu, sel B juga terlibat dalam presentasi antigen, pembentukan pusat germinal, interaksi dengan sel imun lain, dan pembentukan memori imunologis. Karena peran pentingnya, prediksi epitop sel B menjadi hal yang krusial.⁸

Epitop sel B linier dapat diprediksi menggunakan metode Kolaskar & Tongaonkar, yang mengidentifikasi penentu antigenik berdasarkan keberadaan residu hidrofobik (seperti Cys, Leu, dan Val) di permukaan protein.¹⁰ Sumbu X menunjukkan posisi asam amino dalam urutan protein. Setiap titik yang ada dalam sumbu X merepresentasikan posisi asam amino tertentu. Sedangkan sumbu Y menunjukkan nilai prediksi epitop, di mana nilai yang lebih tinggi mengindikasikan potensi yang lebih besar bahwa daerah tersebut adalah epitop sel B. Daerah dengan nilai di atas garis nol menunjukkan posisi kandidat epitop. *Threshold* merupakan



nilai yang menentukan apakah suatu daerah dianggap epitop atau bukan. Nilai *average* merupakan nilai prediksi rerata epitop pada protein. Selanjutnya terdapat nilai minimum, yang menunjukkan nilai prediksi epitop terendah yang ditemukan pada protein yang berada di angka -0.013. Kemudian terdapat nilai maksimum, yang menunjukkan nilai prediksi epitop tertinggi yang ditemukan pada protein yang berada di angka 2.111.¹¹

Setiap baris dalam tabel menunjukkan peptida yang diprediksi. Tabel nomor menunjukkan nomor urut peptida yang diprediksi, *start* menunjukkan posisi asam amino awal dari peptida dalam urutan protein, *end* menunjukkan posisi asam amino akhir dari peptida dalam urutan protein, *peptide* menunjukkan urutan asam amino dari peptida yang diprediksi, dan *length* menunjukkan panjang peptida dalam jumlah asam amino. Pada prediksi epitop sel B pada protein didapatkan tujuh urutan peptida dengan nilai di atas 0.350 dianggap sebagai kandidat epitop sel B. Epitop sel B yang diprediksi sebagai berikut: “MFQDPPEKPRTRGNPFVDTLEQTLCPQEK KRHRWT” Selanjutnya, epitop yang teridentifikasi kemudian dirangkai menggunakan linker (GSG atau GGSGG) untuk meningkatkan stabilitas struktur antigen dan untuk memudahkan proses purifikasi dan deteksi dalam penggunaan diagnostik, His-tag (10 His) dipasang di ujung N-terminal.

Setelah konstruksi epitop selesai, perangkat lunak *AlphaFold* yang digunakan untuk prediksi struktur tersier untuk mengungkap struktur 3D terbaik, seperti yang ditunjukkan pada (Gambar 3). Perangkat lunak ini memprediksi struktur 3D yang tidak didasarkan pada templat protein yang ada saat ini.⁸ Skala ini didasarkan pada nilai pLDDT (*predicted Local Distance Difference Test*), yang merupakan metrik untuk mengukur prediksi struktur tersier protein. Warna biru tua dengan skala pLDDT > 90 menunjukkan prediksi yang sangat tinggi, warna biru muda dengan skala 70 < pLDDT < 90 menunjukkan prediksi yang tinggi, warna kuning dengan skala 50 < pLDDT < 70 menunjukkan prediksi yang rendah, dan warna jingga dengan skala pLDDT < 50 menunjukkan prediksi yang sangat rendah. Nilai pTM digunakan untuk mengukur kesamaan antara struktur prediksi dan struktur templat yang digunakan dalam prediksi, pada (Gambar 3) terlihat bahwa nilai pTM yaitu 0.27.

Sedangkan nilai pIM adalah nilai yang berhubungan dengan prediksi antarmuka dari sebuah struktur protein, pada gambar terlihat bahwa tidak ada nilai pIM. Adapula matriks jarak residu, bagian ini menampilkan matriks berwarna hijau yang menunjukkan jarak antara residu asam amino dalam struktur prediksi. Warna hijau menunjukkan jarak yang lebih dekat, sedangkan warna yang lebih terang menunjukkan jarak yang lebih jauh. Matriks ini memberikan informasi tentang interaksi antar residu dan lipatan protein. Kemudian terdapat skala warna di bawahnya yang menunjukkan skala warna yang digunakan untuk matriks jarak residu. *Expected Position Error* (Angstroms) merupakan error posisi yang diharapkan dalam satuan Angstrom.¹²

Selanjutnya, untuk mengukur afinitas antigen terhadap antibodi tertentu, analisis docking molekuler dengan server *ClusPro 2.0* digunakan.¹³ (Gambar 3) Hasil menunjukkan skor interaksi paling stabil pada *Cluster 12* dengan energi pengikatan terendah (-1215.7 kJ/mol).^{13 14} Kemudian struktur hasil docking dirapikan dengan penambahan chain B untuk setiap asam amino dalam urutan antigen.

Selanjutnya dilakukan analisis ΔG dan KD dilakukan menggunakan server *Prodigy* untuk mengevaluasi energi bebas dan kekuatan interaksi,¹⁵ hasil dapat dilihat pada (Gambar 5). Interaksi antara antigen dan antibodi 3v6f menunjukkan ikatan yang kuat, terlihat dari nilai energi bebas ikatan dan konstanta disosiasi yang signifikan. Hal ini dibuktikan dengan nilai ΔG yang sangat negatif serta konstanta disosiasi (Kd) yang juga negatif. Semakin negatif nilai Kd, semakin kuat interaksi yang terjadi pada kompleks tersebut, sehingga semakin sulit untuk melepaskannya.⁸ ΔG (kJ mol⁻¹) menunjukkan perubahan energi bebas Gibbs (ΔG) dari pengikatan protein-protein.¹⁶ ΔG adalah ukuran energi yang dilepaskan atau diserap selama reaksi pengikatan. Nilai negatif menunjukkan bahwa pengikatan adalah reaksi yang menguntungkan secara spontan. Selanjutnya nilai Kd(M)at°C menunjukkan konstanta disosiasi (Kd) dari kompleks protein-protein, diukur dalam molar (M) pada suhu tertentu. Kd adalah ukuran afinitas pengikatan, dengan nilai Kd yang lebih rendah menunjukkan afinitas pengikatan yang lebih tinggi. Adapun *ICs* (*Interfacial Contacts*) yang menunjukkan jumlah kontak antarmuka antara residu asam amino dari



dua protein dalam kompleks.^{15 17} Kolom-kolom tersebut dikategorikan kontak berdasarkan jenis interaksi: (1) *ICs charged-charged*: Kontak antara residu asam amino bermuatan positif dan negatif. (2) *ICs charged-polar*: Kontak antara residu asam amino bermuatan dan polar. (3) *ICs charged-apolar*: Kontak antara residu asam amino bermuatan dan apolar. (4) *ICs polar-polar*: Kontak antara residu asam amino polar. (5) *ICs polar-apolar*: Kontak antara residu asam amino polar dan apolar. (6) *ICs apolar-apolar*: Kontak antara residu asam amino apolar.

Serta kolom terakhir yaitu NIS (*Normalized Interfacial Surface*) yang menunjukkan luas permukaan antarmuka yang dinormalisasi antara dua protein dalam kompleks.¹⁷ NIS *charged* menunjukkan luas permukaan antarmuka yang dinormalisasi untuk residu asam amino bermuatan dengan nilai 19.76 dan NIS apolar menunjukkan luas permukaan antarmuka yang dinormalisasi untuk residu asam amino apolar dengan nilai 32.17.

Pada penelitian ini, dianalisis kekuatan dan lokasi interaksi marker multiepitop untuk kit diagnostik berbasis *Lateral Flow Assay* dari protein E6 HPV (Gambar 5) menunjukkan interaksi yang kompleks dari marker multiepitop untuk kit diagnostik. Analisis interaksi molekul lebih lanjut dengan PDBSum ditemukan 21 ikatan hidrogen dan 230 kontak *non-bonded* antara antigen dan antibodi. Ini menunjukkan afinitas tinggi, yang dapat meningkatkan sensitivitas diagnostik.¹⁸

Sebagai langkah terakhir, untuk memungkinkan *cloning in silico* pada plasmid ekspresi pET-28a digunakan perangkat lunak SnapGene, sekuens antigen dimasukkan kembali ke urutan DNA menggunakan EMBOSS *Backtranseq*. Setelah dilakukan proses *reverse translation* dan *cloning in silico* dengan diterjemahkan kembali ke DNA menggunakan EMBOSS *Backtranseq* menjadi urutan basa DNA sebagai berikut, "ATGTTCCAGGACCCGGAAGAAAACCG CGTACCGGTTCTGGTCGTGGTTCTGGTG GTAACCGTTCGGTTCTGGTGTTGGTTCT GGTGACACCCTGGAACAGACCGGTTCTG GTCTGTGCCCGCAGGAAAAAAACGTCA CGGTTCTGGTCGTTGGACC". Kemudian urutan basa DNA tersebut ditambahkan kodon start dan kodon stop sebelum disisipkan ke dalam plasmid ekspresi yaitu pET-28a (+). E6 HPV adalah protein yang memiliki 150–160 asam

amino yang mengkode protein dengan berat molekul sebesar 18 kDa.¹⁹ Vektor pET dilengkapi dengan promotor T7 yang kuat, sehingga menjadikannya pilihan utama untuk kloning dan ekspresi protein.²⁰ Dengan kemampuan ekspresi yang tinggi, kombinasi antara vektor pET dan strain E. coli BL21 (DE3) telah menjadi sistem ekspresi yang paling banyak diminati dalam bidang biofarmasi dan industri.²⁰ Pengerjaan *cloning in silico* ini menggunakan perangkat lunak SnapGene dengan menambahkan situs pengenalan enzim restriksi pada urutan DNA sisipan. Selanjutnya simulasi PCR menunjukkan bahwa fragmen DNA berhasil ditempatkan di situs restriksi yang tepat yaitu BamHI dan HindIII untuk ekspresi protein rekombinan. Sehingga, pembuatan antigen berbasis multiepitop dari protein E6 HPV ini berpotensi untuk diaplikasikan sebagai marker dalam kit diagnostik LFA, dan dapat membantu mendeteksi infeksi HPV lebih awal dalam mencegah kanker serviks.

Pada urutan DNA tersebut didapatkan hasil *cloning* yang baik karena DNA target yaitu protein E6 HPV dan plasmid pET-28a dapat berikatan dengan baik. Hasilnya Warna merah pada hasil menunjukkan letak DNA sisipan berada yaitu pada daerah *Multi Cloning Site (MCS)* menggunakan enzim restriksi BamHI dan HindIII.

KESIMPULAN

Protein E6 merupakan onkoprotein utama yang berperan dalam degradasi p53 dan menjadi biomarker spesifik untuk infeksi HPV beresiko tinggi. Prediksi multiepitop protein E6 pada tipe HPV risiko tinggi menunjukkan bahwa protein E6 HPV dengan deteksi berbasis multiepitop yang dapat meningkatkan sensitivitas dan spesifisitas dalam mendeteksi respon imun terhadap infeksi HPV. Dengan mengambil prediksi epitop sel B dengan *IEDB Cell Epitop Prediction* didapatkan hasil protein yang memiliki struktur tersier 3D yang rendah; namun setelah docking dengan antibodi 3v6f didapatkan *Cluster 12* yang memiliki interaksi paling stabil dengan energi pengikatan paling rendah. Selain itu, hasil *docking* memiliki nilai ΔG yang sangat negatif serta K_d yang juga negatif sehingga interaksi antara antigen dan antibodi 3v6f menunjukkan ikatan yang kuat; ditemukan 21 ikatan hidrogen dan 230 kontak *non-bonded*



antara antigen dan antibodi, hal ini menunjukkan afinitas tinggi yang dapat meningkatkan sensitivitas diagnostik. *Cloning in silico* dengan SnapGene didapatkan hasil pada pembuatan antigen berbasis multiepitop dari protein E6 HPV ini berpotensi untuk diaplikasikan sebagai marker dalam kit diagnostik LFA. Dengan demikian hasil prediksi multiepitop pada protein E6 HPV berpotensi dijadikan kit diagnostik yang spesifik untuk skrining infeksi HPV lebih awal dalam mencegah kanker serviks. Pada penelitian ini, dianalisis kekuatan dan lokasi interaksi marker multiepitop untuk kit diagnostik berbasis *Lateral Flow Assay (LFA)* dari protein E6 HPV menunjukkan interaksi yang kompleks dari marker multiepitop untuk kit diagnostik. Dari penelitian ini didapatkan hasil prediksi multiepitop pada protein E6 HPV dapat dijadikan kit diagnostik yang spesifik untuk skrining pada kanker serviks.

DAFTAR PUSTAKA

1. Moody, C. A. & Laimins, L. A. Human papillomavirus oncoproteins: Pathways to transformation. *Nat. Rev. Cancer* **10**, 550–560 (2010).
2. Hoffman, B. L. *et al. Williams GYNECOLOGY*. (Mc Graw Hill Education, 2016).
3. Sung, H. *et al.* Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA. Cancer J. Clin.* **71**, 209–249 (2021).
4. Kemenkes RI. *Profil Kesehatan Indonesia 2021*. Pusdatin.Kemkes.Go.Id (2022).
5. Bhattacharjee, R. *et al.* Mechanistic role of HPV-associated early proteins in cervical cancer: Molecular pathways and targeted therapeutic strategies. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* **174**, 103675 (2022).
6. Brimer, N., Drews, C. M. & Vande Pol, S. B. Association of papillomavirus E6 proteins with either MAML1 or E6AP clusters E6 proteins by structure, function, and evolutionary relatedness. *PLoS Pathog.* **13**, 1–27 (2017).
7. Yang, J. *et al.* Improved protein structure prediction using predicted interresidue orientations. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **117**, 1496–1503 (2020).
8. Rizarullah, N., Aditama, R., Giri-Rachman, E. A. & Hertadi, R. Designing a Novel Multiepitope Vaccine from the Human Papilloma Virus E1 and E2 Proteins for Indonesia with Immunoinformatics and Molecular Dynamics Approaches. *ACS Omega* **9**, 16547–16562 (2024).
9. Jabbar, B. *et al.* Antigenic Peptide Prediction From E6 and E7 Oncoproteins of HPV Types 16 and 18 for Therapeutic Vaccine Design Using Immunoinformatics and MD Simulation Analysis. *Front. Immunol.* **9**, 1–14 (2018).
10. Kolaskar, A. S. & Tongaonkar, P. C. A semi-empirical method for prediction of antigenic determinants on protein antigens. *FEBS Lett.* **276**, 172–174 (1990).
11. Vita, R. *et al.* The Immune Epitope Database (IEDB): 2018 update. *Nucleic Acids Res.* **47**, D339–D343 (2019).
12. Carugo, O. Globular Protein Local Flexibility. 1–9 (2023).
13. Kozakov, D. *et al.* The ClusPro web server for protein-protein docking. *Nat. Protoc.* **12**, 255–278 (2017).
14. Kozakov, D. *et al.* NIH Public Access. **81**, 2159–2166 (2014).
15. Vangone, A. *et al.* Large-scale prediction of binding affinity in protein-small ligand complexes: The PRODIGY-LIG web server. *Bioinformatics* **35**, 1585–1587 (2019).
16. Vangone, A. & Bonvin, A. M. J. J. Contacts-based prediction of binding affinity in protein-protein complexes. *Elife* **4**, 1–15 (2015).
17. Klara, I. K., Purwono, R. M. & Achmadi, P. Analisis In Silico Senyawa Flavonoid Kayu Secang (*Caesalpinia sappan* L.) pada Reseptor α -Amilase Sebagai Antihiperqlikemik. *Acta Vet. Indones.* **11**, 210–219 (2023).
18. Laskowski, R. A., Jabłońska, J., Pravda, L., Vařeková, R. S. & Thornton, J. M. PDBsum: Structural summaries of PDB entries. *Protein Sci.* **27**, 129–134 (2018).



19. Pal, A. & Kundu, R. Human Papillomavirus E6 and E7: The Cervical Cancer Hallmarks and Targets for Therapy. *Front. Microbiol.* **10**, (2020).
20. Li, L. *et al.* Expression and purification of soluble recombinant β -lactamases using *Escherichia coli* as expression host and pET-28a as cloning vector. *Microb. Cell Fact.* **21**, 1–9 (2022).

