

DESAIN VAKSIN MULTI-EPITOP TERHADAP VIRUS MARBURG (MARV) BERBASIS PROTEIN VP35 MENGGUNAKAN PENDEKATAN IMMUNOINFORMATIKA: IN-SILICO

**Ilham Nurfadilah Asopari¹, Anindita Tri Kusuma Pratita¹, Richa Mardianingrum²,
Ruswanto Ruswanto^{1*}**

¹Program Studi Farmasi, Fakultas Farmasi, Universitas Bakti Tunas Husada, Tasikmalaya

²Program Studi Farmasi, Fakultas Ilmu Kesehatan, Universitas Perjuangan, Tasikmalaya

*Email: ruswanto@universitas-bth.ac.id

Received: 16/04/2025, Revised: 13/07/2025, Accepted: 15/08/2025, Published: 31/08/2025

ABSTRAK

Virus Marburg (MARV) merupakan salah satu virus zoonosis dari keluarga Filoviridae dengan tingkat kematian hingga 88%. Pertumbuhan populasi global yang pesat meningkatkan risiko paparan penyakit akibat perubahan iklim dan ekologi. Untuk pencegahan, vaksin menjadi upaya terbaik. Penelitian ini bertujuan merancang vaksin berbasis peptida dari protein VP35 dan mengevaluasi interaksinya dengan sistem imun (TLR3, MHC-I, dan MHC-II) berdasarkan parameter stabilitas interaksi molekuler seperti skor ikatan, nilai elektrostatis, dan desolvasi. Metode yang digunakan adalah pendekatan immunoinformatics secara in silico, meliputi pemilihan protein target, prediksi antigenisitas, prediksi epitop T CD8+, prediksi epitop T CD4+, prediksi epitop B, konstruksi vaksin & visualisasi 3D, validasi struktur vaksin, analisis docking dan prediksi cakupan populasi. Hasil menunjukkan bahwa desain vaksin memiliki interaksi yang stabil terhadap TLR3, MHC-I (HLA-A*11:01), dan MHC-II (HLA-DR1), dengan nilai skor total berturut-turut sebesar -43,698, -42,192, dan -51,899, menunjukkan afinitas ikatan yang kuat secara in silico. Temuan ini mengindikasikan potensi desain vaksin berbasis epitop VP35 sebagai kandidat imunogenik terhadap MARV, meskipun perlu dioptimalkan lebih lanjut mengingat cakupan populasi yang masih terbatas.

Kata kunci: Virus Marburg, Filoviridae, imunoinformatika, vaksin multi-epitop, protein VP35, desain vaksin

ABSTRACT

Marburg virus (MARV) is a zoonotic virus from the Filoviridae family with a fatality rate of up to 88%. The rapid growth of the global population increases the risk of exposure to infectious diseases driven by climate and ecological changes. Vaccination remains the most effective preventive measure. This study aimed to design a peptide-based vaccine derived from the VP35 protein and to evaluate its interactions with immune system components (TLR3, MHC-I, and MHC-II) based on molecular interaction stability parameters, including binding score, electrostatic energy, and desolvation energy. The design process employed an in silico immunoinformatics approach, comprising target protein selection, antigenicity prediction, T-

*cell epitope (CD8⁺) prediction, T-cell epitope (CD4⁺) prediction, B-cell epitope prediction, vaccine construct design and 3D visualization, structural validation, molecular docking analysis, and population coverage prediction. The results demonstrated that the designed vaccine exhibited stable interactions with TLR3, MHC-I (HLA-A*11:01), and MHC-II (HLA-DR1), with total binding scores of -43.698, -42.192, and -51.899, respectively, indicating strong binding affinities in silico. These findings suggest that the VP35 epitope-based vaccine design holds promise as an immunogenic candidate against MARV; however, further optimization is required given its currently limited population coverage.*

Keywords: Marburg virus, Filoviridae, immunoinformatic, multi-epitope vaccine, VP35 protein, vaccine design

PENDAHULUAN

Urbanisasi yang pesat, perubahan iklim, dan pergeseran ekologi akibat aktivitas manusia telah meningkatkan frekuensi interaksi antara manusia dan hewan liar, sehingga memicu kemunculan berbagai penyakit zoonosis (Mahmud et al., 2019). Kondisi ini menguntungkan bagi penyebaran virus RNA yang memiliki laju mutasi tinggi dan kemampuan adaptasi yang cepat, termasuk virus dari keluarga Filoviridae. Keluarga virus ini menjadi perhatian global karena mampu menimbulkan wabah dengan angka kematian tinggi, sehingga menimbulkan ancaman serius terhadap kesehatan masyarakat (Abir et al., 2022).

Salah satu anggota Filoviridae adalah virus Marburg (MARV) yang pertama kali diidentifikasi pada tahun 1967. Virus ini menyebabkan penyakit demam berdarah Marburg (Marburg Virus Disease, MVD) dengan angka kematian mencapai 88–90% (World Health Organization, 2023). Penularan MARV dapat terjadi melalui

kontak langsung dengan darah atau cairan tubuh hewan terinfeksi, terutama kelelawar buah, serta penularan antarmanusia. Wabah besar telah terjadi pada tahun 1998 dan 2004, dengan kasus terbaru tercatat di Guinea pada 9 Agustus 2021 (Abir et al., 2022). Infeksi MARV dapat menyebabkan demam berdarah berat, disfungsi organ, dan kematian. Tantangan pengendalian penyakit ini semakin besar karena hingga kini belum tersedia vaksin berlisensi atau pengobatan efektif, sementara data klinis masih terbatas akibat jarang terjadi wabah berskala besar (Mahmud et al., 2019; Abir et al., 2022).

Pengembangan vaksin konvensional, seperti vaksin hidup yang dilemahkan atau vaksin inaktivasi, menghadapi tantangan besar untuk virus dengan tingkat virulensi tinggi seperti MARV. Produksinya memerlukan fasilitas laboratorium dengan tingkat biosafety tinggi (BSL-4), waktu pengembangan yang panjang, dan berisiko menimbulkan reaksi merugikan pada individu dengan gangguan imun (Sami et

al., 2021). Selain itu, tingginya variabilitas genetik virus RNA dapat mengurangi efektivitas vaksin konvensional dalam jangka panjang (Marzi et al., 2021). Kondisi ini menegaskan perlunya pendekatan alternatif yang lebih aman, spesifik, dan cepat dikembangkan.

Salah satu alternatif yang menjanjikan adalah pendekatan imunoinformatika untuk merancang vaksin multi-epitop berbasis peptida. Strategi ini memungkinkan pemilihan epitop konservatif yang mampu memicu respons imun adaptif secara spesifik, sekaligus meminimalkan risiko efek samping. Keberhasilan pendekatan ini telah dibuktikan pada pengembangan vaksin COVID-19 (Kar et al., 2020) dan vaksin epitop untuk virus Ebola (Sakabe et al., 2018), yang menunjukkan potensi besar dalam memicu respons imun protektif.

Pada MARV, salah satu protein penting adalah VP35 yang berperan sebagai antagonis respons imun inang dan memiliki potensi imunogenik yang tinggi (Mahmud et al., 2019). Namun, kajian desain vaksin multi-epitop yang menargetkan VP35 masih sangat terbatas. Oleh karena itu, penelitian ini dilakukan untuk merancang kandidat vaksin multi-epitop berbasis peptida dari protein VP35 menggunakan pendekatan imunoinformatika. Studi ini mencakup prediksi sifat antigenisitas,

imunogenisitas, toksisitas, serta analisis interaksi molekuler dengan komponen sistem imun seperti TLR3, MHC-I (HLA-A*11:01), dan MHC-II (HLA-DR1), dengan tujuan menghasilkan kandidat vaksin potensial yang dapat dikembangkan lebih lanjut.

METODE PENELITIAN

Alat dan Bahan

Alat yang digunakan berupa perangkat keras dan perangkat lunak. Perangkat keras berupa seperangkat PC untuk studi in-silico dengan spesifikasi LAPTOP DESKTOP-IlhamN Intel® Core (TM) i3-M370 @ 2.40GHz (4 CPUs) ~ 2.4GHz, sistem operasi Windows 10 Pro 64-bit operating system, x64-based processor (10.0, Build 19045), RAM 6,0 GB. Perangkat lunak yang digunakan berupa Notepad, adapaun database dan web server yang disajikan pada Tabel 1.

Bahan penelitian yang digunakan adalah reseptor protein VP35 UniProt ID P35259, Alel HLA-A 11*01 (MHC-I) (Firmansyah et al., 2021) PDB ID 1X7Q, Alel HLA-DR1 (MHC-II) PDB ID 4I5B (Syakuran, 2020), TLR3 PDB ID 1ZIW dan adjuvan 50S Ribosomal Protein L7/L12 Uniprot ID P0A7K2 (Syakuran, 2020).

Jalannya Penelitian

1. Pencarian data protein

Protein yang diperoleh dari web server basis database UniProt (Ruswanto et al., 2023) dan National Center for Biotechnology Information (NCBI). Protein yang didapatkan kemudian disimpan dalam format FASTA Sequence pada software Notepad.

2. Prediksi antigenisitas sekuens protein

Protein yang diperoleh dievaluasi antigenisitas, kemungkinan antigen positif atau antigen negatif menggunakan server web VaxiJen 2.0, dengan mempertimbangkan ambang batas 0,4 atau lebih tinggi untuk meningkatkan tingkat spesifisitas (Khasana et al., 2023).

3. Pemilihan protein target

Protein target yang digunakan adalah protein VP35 (strain Musoke-80) dari virus Marburg dengan nomor akses UniProt ID P35259, diperoleh dari basis data UniProt (<https://www.uniprot.org>) (Ruswanto et al., 2023) dan NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Pemilihan sekuens didasarkan pada hasil uji antigenisitas tertinggi yang memenuhi ambang batas $>0,4$ (Firmansyah et al., 2021).

4. Prediksi antigenisitas

Evaluasi antigenisitas dilakukan menggunakan server web VaxiJen 2.0

(<http://www.ddg-pharmfac.net/vaxijen/VaxiJen/VaxiJen.html>) dengan ambang batas 0,4 untuk meningkatkan spesifisitas prediksi (Khasana et al., 2023). Nilai antigenisitas yang lebih tinggi menunjukkan potensi imunogenik yang lebih baik (Rezaldi et al., 2021).

5. Prediksi epitop T CD8⁺

Prediksi epitop sel T CD8⁺ (MHC-I) dilakukan menggunakan NetCTL 1.2 (<https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?NetCTL-1.2>) dengan ambang batas 0,95 untuk memperoleh sensitivitas 0,74 dan spesifisitas 0,98 (NetCTL, 2023). Epitop yang lolos seleksi diuji antigenisitasnya dengan VaxiJen 2.0 (threshold 0,4), kemudian dianalisis imunogenisitasnya menggunakan IEDB Immunogenicity Tool (<http://tools.iedb.org/immunogenicity/>) (Rezaldi et al., 2021). Epitop terpilih diuji afinitas pengikatannya terhadap MHC-I menggunakan IEDB MHC-I Binding Prediction (<http://tools.iedb.org/mhci/>) dengan kriteria IC50 <200 nM (Firmansyah et al., 2021).

6. Prediksi epitop T CD4⁺

Prediksi epitop sel T CD4⁺ (MHC-II) dilakukan dengan IEDB Tepitool (<http://tools.iedb.org/tepitool/>) menggunakan metode consensus, kemudian dipilih lima percentile rank

teratas (semakin kecil nilai percentile rank, semakin baik afinitasnya) (Rezaldi et al., 2021). Epitop yang memenuhi kriteria kemudian diuji antigenisitasnya menggunakan VaxiJen 2.0.

7. Prediksi epitop B

Prediksi epitop sel B dilakukan dengan platform IEDB B-cell Epitope Prediction Tools (<http://tools.iedb.org/bcell/>) menggunakan tiga model: Bepipred Linear Epitope, Emini Surface Accessibility, dan Kolaskar & Tongaonkar (Firmansyah et al., 2021). Epitop terpilih memiliki panjang 12 asam amino (12-mer) dan diuji antigenisitas (VaxiJen 2.0), toksisitas menggunakan ToxinPred (<http://crdd.osdd.net/raghava/toxinpred/>), serta alergenitas menggunakan AllerTOP v2.0 (<https://www.ddg-pharmfac.net/AllerTOP/>) (Rezaldi et al., 2021; Khairkhah et al., 2020).

8. Konstruksi vaksin & visualisasi 3D

Epitop MHC-I, MHC-II, dan sel B terpilih digabungkan menggunakan linker spesifik (AAY untuk epitop MHC-I dan GP GPG untuk epitop MHC-II serta sel B). Adjuvan 50S ribosomal protein L7/L12 (UniProt ID: P0A7K2) ditambahkan pada ujung N-terminal melalui linker EAAAK untuk meningkatkan respons imun (Syakuran, 2020). Ekor 6xHis ditempatkan di ujung C-terminal untuk memudahkan

pemurnian protein (Naveed et al., 2021). Visualisasi struktur 3D vaksin dilakukan dengan server trRosetta (<https://yanglab.nankai.edu.cn/trRosetta/>).

9. Validasi struktur vaksin

Struktur primer dianalisis menggunakan ProtParam (<https://web.expasy.org/protparam/>) untuk memprediksi sifat fisikokimia, serta BLASTp (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) untuk memastikan tidak ada homologi signifikan dengan protein manusia (Rawal et al., 2021). Struktur sekunder dianalisis menggunakan SOPMA (https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=/NPSA/npsa_sopma.html), sedangkan struktur tersier dimodelkan dan direfinasi dengan GalaxyRefine2 (<http://galaxy.seoklab.org/cgi-bin/submit.cgi?type=REFINE2>) (Khairkhah et al., 2020). Kualitas model divalidasi dengan Ramachandran Plot (PROCHECK) (<https://www.ebi.ac.uk/thornton-srv/software/PROCHECK/>) dan ERRAT2 (<http://services.mbi.ucla.edu/ERRAT/>) (Renadi et al., 2023).

10. Analisis docking

Interaksi molekuler antara desain vaksin dan reseptor sistem imun (TLR3, MHC-I HLA-A*11:01, dan MHC-II HLA-

DR1) dianalisis menggunakan PyDock (<https://life.bsc.es/pid/pydockweb/>).

Parameter yang diamati meliputi total skor, energi elektrostatik, energi desolvasi, dan interaksi van der Waals (Firmansyah et al., 2021).

11. Prediksi cakupan populasi

Cakupan populasi dihitung menggunakan IEDB Population Coverage Analysis (<http://tools.iedb.org/population/>) berdasarkan kombinasi epitop dan alel MHC-I/MHC-II terpilih. Analisis ini mengacu pada distribusi alel HLA di populasi target untuk menilai potensi efektivitas vaksin di tingkat populasi (Ong et al., 2020; Firmansyah et al., 2021).

protein dilakukan pada database UniProt dan NCBI. Dicari protein berupa Protein VP35 (strain Mukose-80) pada virus marburg dengan nomor akses UniProt ID P35259. Pertimbangan pemilihan sekuens yaitu dengan hasil uji antigenisitas tertinggi sebesar 0.4360 yang memenuhi persyaratan dengan ambang batas >0.4.

2. Prediksi antigenisitas dan pemilihan sekuens protein

Kemampuan antigen untuk menstimulasi pembentukan antibodi disebut dengan antigenitas (Rezaldi et al., 2021). Hasil prediksi antigenitas oleh VaxiJen 2.0 dengan Threshold 0,4 disajikan pada Tabel 2.

HASIL DAN PEMBAHASAN

1. Pencarian data protein

Protein yang digunakan diperoleh dari UniProt dan NCBI, Pencarian data

Tabel 2. Prediksi antigenisitas sekuens protein

No	Nama Strain Virus	Accession	Nilai Antigenitas	Keterangan
1.	Musoke-80	P35259	0,5417	(Antigen)
2.	Ozolin-75	Q6UY68	0,4330	(Antigen)

Threshold diatur berdasarkan referensi Rawal et al., 2021 sekuens memicu antigenitas dengan nilai lebih dari threshold, namun hanya sekuens dengan antigenitas tertinggi yang dapat dijadikan sebagai bahan untuk kandidat desain vaksin. Berdasarkan Firmansyah et al.,

2021, semakin tingginya antigenitas maka semakin tinggi pula titer antibodi untuk melawan infeksi.

3. Prediksi epitop sel T

Prediksi Epitop sel T CD8+ dengan UniProt ID P35259 dilakukan pada 12 supertipe dan hasilnya keseluruhan supertipe memenuhi syarat melebihi

threshold hasil setting pada NetCTL. Threshold yang digunakan yaitu 0,95 untuk memperoleh 0,74 sensitifitas dan 0,98 spesifisitas (NetCTL., 2023). Namun hasil uji antigenisitas pada supertipe A24, A26, B27, B39, B44 tidak ditemukannya epitop terpilih dengan memenuhi syarat antigenisitas dengan ambang batas $>0,4$

dikarenakan scorenya tidak memenuhi syarat maka diambil sebanyak 29 epitop. Sebanyak 29 epitop sel T CD8⁺ hasil prediksi NetCTL didapatkan dari 8 supertipe. Epitop yang melebihi threshold pada NetCTL diuji antigenitasnya dengan threshold 0,4 hasil ditunjukkan pada Tabel 3.

Tabel 3. Hasil prediksi epitop MHC-I

No	Supertipe	MHC-1 epitop	Score	Nilai Antigenitas	Keterangan
1	A1	STDDIIWDQ	1,9127	0,0827	(Non-Antigen)
		ISDIQSTLS	0,9891	0,8682	(Antigen)
		FLDAFHQIL	1,1068	-0,6966	(Non-Antigen)
		GMSEMLAKY	1,2092	-0,0859	(Non-Antigen)
2	A2	TLADLLIPI	1,3825	0,3342	(Non-Antigen)
		MLAKYDHLV	1,3690	0,6226	(Antigen)
		FLDAFHQIL	1,3434	-0,6966	(Non-Antigen)
		TLSEVTTRV	1,2957	0,6653	(Antigen)
		YMQQVSEGL	1,2718	0,5049	(Antigen)
		RTFDAFLGV	1,2128	0,6219	(Antigen)
		QLHEITPVL	1,2382	0,6599	(Antigen)
		GLMTGKVPI	1,0860	0,5606	(Antigen)
		RQLHEITPV	1,0145	0,9367	(Antigen)
		FLGVVPPVI	1,0314	0,5016	(Antigen)
		ILAQVLSKI	1,0141	-0,0281	(Non-Antigen)
3	A3	KLYKRRKPK	1,6421	-0,4083	(Non-Antigen)
		HILAQVLSK	1,5360	0,0253	(Non-Antigen)
		QVLSKIAIK	1,4503	0,7299	(Antigen)
		IIWDQLIVK	1,2804	0,0562	(Non-Antigen)
		GVAQQACSK	1,0804	-0,0620	(Non-Antigen)
		QTVPRPSQK	1,1012	0,4331	(Antigen)
4	A24	AFLDAFHQI	1,2727	-0,3359	(Non-Antigen)
5	A26	AISKGMSEM	1,2583	0,2544	(Non-Antigen)
		DAADKMSKV	0,9776	0,1424	(Non-Antigen)
		HLPGNNTPF	1,0165	-0,2219	(Non-Antigen)
6	B7	VPRPSQKSL	1,7767	0,4979	(Antigen)
		RPSQKSLRA	1,4286	1,0356	(Antigen)
		KPNLSAKDL	1,3690	1,5957	(Antigen)
		SPCLMSKAT	0,9925	1,0496	(Antigen)
		APAAAFDAY	1,1293	-0,0402	(Non-Antigen)
7	B8	NLSAKDLAL	1,2350	1,8137	(Antigen)
		YMQQVSEGL	1,2248	0,5049	(Antigen)
		IVKRTLADL	1,1865	0,3803	(Non-Antigen)
		VPRPSQKSL	1,1344	0,4979	(Antigen)

No	Supertipe	MHC-1 epitop	Score	Nilai Antigenitas	Keterangan
		KLYKRRKPK	1,0525	-0,4083	(Non-Antigen)
		RLSRTFDAF	1,0881	0,1765	(Non-Antigen)
		LAKYDHLVI	1,0112	0,8075	(Antigen)
		FLDAFHQIL	1,0305	-0,6966	(Non-Antigen)
8	B27	GRTLEAISK	1,4385	0,3891	(Non-Antigen)
9	B39	FLDAFHQIL	1,7589	-0,6966	(Non-Antigen)
		SEQGETRAL	1,0779	0,1243	(Non-Antigen)
		AADKMSKVL	1,0248	0,0996	(Non-Antigen)
10	B44	SEQGETRAL	1,5585	0,1243	(Non-Antigen)
		EETFSKPNL	1,4879	-0,0463	(Non-Antigen)
		HEITPVLKM	0,9671	1,0291	(Antigen)
11	B58	KSGAFLDAF	1,3987	0,0195	(Non-Antigen)
		VPRPSQKSL	1,4688	0,4979	(Antigen)
		ATSTDDIHW	1,2674	0,3608	(Non-Antigen)
		RAVPPNPTI	1,0683	0,8481	(Antigen)
		RLSRTFDAF	0,9534	0,2240	(Non-Antigen)
12	B62	RTTAPAAAF	1,4231	0,4463	(Antigen)
		AQVLSKIAY	1,4401	0,4700	(Antigen)
		HLPGNNTPF	1,2713	-0,2219	(Non-Antigen)
		RLSRTFDAF	1,2424	0,1765	(Non-Antigen)
		YMQQVSEGL	1,1451	0,5049	(Antigen)
		GMSEMLAKY	1,2358	-0,0859	(Non-Antigen)
		QLHEITPVL	1,0843	0,6599	(Antigen)
		RQLHEITPV	0,9564	0,9367	(Antigen)
		ALTRLSRTF	1,1473	0,3033	(Non-Antigen)
		YKSGKSGAF	0,9997	1,0358	(Antigen)
		IDKGWVCVY	0,9677	0,6472	(Antigen)

Keterangan : Epitop Berwarna merupakan epitop terpilih yang akan maju keprediksi selanjutnya.

Firmansyah et al., 2021 menyatakan 4 epitop dengan antigenitas tertinggi yang melebihi threshold 0,4 pada setiap supertipe menjadi epitop terpilih yang akan

diprediksi Imunogenitas dan afinitasnya, Hasil imunogenitas harus bernilai positif agar dapat memicu respon imun (Rezaldi et al., 2021). Hasil disajikan pada Tabel 4.

Tabel 4. Hasil prediksi immunogenisitas pada epitop terpilih

No	Supertipe	MHC-1 epitop	Lenght	Score Imunogenisitas
1.	A1	ISDIQSTLS	9	-0,10113
2.	A2	MLAKYDHLV	9	-0,16620
		TLSEVTTRV	9	0,18679
		YMQQVSEGL	9	-0,16539
		RTFDAFLGV	9	0,21906
		QLHEITPVL	9	0,29215
		GLMTGKVPI	9	-0,15958
		RQLHEITPV	9	0,27801
		FLGVVPPVI	9	0,09706

No	Supertipe	MHC-1 epitop	Lenght	Score Imunogenisitas
3.	A3	QVLSKIAAYK	9	-0,22393
		QTVPRPSQK	9	-0,16510
6.	B7	VPRPSQKSL	9	-0,54316
		RPSQKSLRA	9	-0,51511
		KPNLSAKDL	9	-0,30657
		SPCLMSKAT	9	-0,51453
7.	B8	NLSAKDLAL	9	-0,18995
		YMQQVSEGL	9	-0,16539
		VPRPSQKSL	9	-0,54316
		LAKYDHLVI	9	-0,00691
10.	B44	HEITPVLKM	9	-0,02504
11.	B58	VPRPSQKSL	9	-0,54316
		RAVPPNPTI	9	-0,00133
12.	B62	RTTAPAAAF	9	0,13388
		AQVLSKIAAY	9	-0,22668
		YMQQVSEGL	9	-0,16539
		QLHEITPVL	9	0,29215
		RQLHEITPV	9	0,27801
		YKSGKSGAF	9	-0,33387
		IDKGWVCVY	9	0,19728

Keterangan : Epitop berwarna merupakan epitop terpilih yang akan maju keprediksi selanjutnya.

Prediksi afinitas dilakukan pada IEDB-AR dengan kriteria $IC_{50} < 200$ nM menggunakan algoritma NN-align (Neural Network alignment), NN terdiri dari kumpulan unit sampel yang membentuk jaringan komunikasi seperti neuron di otak. Unit akan merespon jika ada sinyal masuk,

yang berperan sebagai unit ialah residu asam amino dari MHC-I, sedangkan sinyal adalah residu protein yang diprediksi (MARV). Algoritma ini bekerja dengan meniru sistem kerja otak (Rezaldi et al., 2021). Hasil ditunjukkan pada Tabel 5

Tabel 5. Hasil prediksi afinitas pada epitop terpilih ($IC_{50} < 200$ nM)

Supertipe	Epitop MHC-I	Alel	IC50 (nM)	Percentile Rank
A2	TLSEVTTRV	HLA-A*02:03	3,19	0,03
		HLA-A*02:01	11,85	0,10
		HLA-A*68:02	19,92	0,18
		HLA-A*02:06	55,35	0,55
	RTFDAFLGV	HLA-A*02:06	2,91	0,02
		HLA-A*68:02	10,22	0,09
		HLA-A*02:03	21,43	0,36
		HLA-A*30:01	24,1	0,13
		HLA-A*02:01	25,12	0,22
		HLA-A*32:01	190,21	0,16

Supertype	Epitop MHC-I	Alel	IC ₅₀ (nM)	Percentile Rank
B62	QLHEITPVL	HLA-A*02:01	50,84	0,46
		HLA-A*02:03	75,06	0,98
	RQLHEITPV	HLA-A*02:06	2,88	0,02
		HLA-A*02:03	15,15	0,25
		HLA-A*02:01	29,62	0,27
	FLGVVPPVI	HLA-A*02:01	37,64	0,34
		HLA-A*02:03	52,33	0,78
	RTTAPAAAF	HLA-B*58:01	41,76	0,24
		HLA-A*32:01	53,1	0,06
		HLA-B*57:01	196,18	0,52
	QLHEITPVL	HLA-A*02:01	50,84	0,46
		HLA-A*02:03	75,06	0,98
	RQLHEITPV	HLA-A*02:06	2,88	0,02
		HLA-A*02:03	15,15	0,25
		HLA-A*02:01	29,62	0,27
	IDKGWVCVY	HLA-A*30:02	300,84	0,82
		HLA-B*15:01	319,05	1,10
		HLA-B*35:01	6890,64	5,00

Keterangan : Epitop berwarna merupakan epitop terpilih yang akan maju keprediksi selanjutnya.

Afinitas dikriteriakan $IC_{50} < 200$ nM, nilai Konsentrasi Inhibisi 50% berarti adanya 50% bagian peptida yang terikat ke MHC (Rezaldi et al., 2021). Menurut IEDBAR IC_{50} dengan range tersebut memiliki afinitas intermediete, sedangkan high affinity < 50 nM. Artinya hasil didapatkan bahwa epitop terpilih ada pada range high dan intermediate affinity.

Epitop yang memenuhi $IC_{50} < 200$ nM dan imunogenitas positif dilanjutkan keprediksi berikutnya.

Selanjutnya prediksi epitop sel T CD4 atau MHC-II menggunakan web server Tepitool IEDB dengan metode consensus, hasil 5 Percentile Rank teratas

dipilih untuk diuji lebih lanjut, disajikan pada Tabel 6.

Tabel 6. Hasil prediksi epitop dan prediksi antigenisitas pada MHC-II

No	MHC-II Epitop	Median Consensus Percentile	Nilai Antigenitas	Keterangan
1.	YDHLVISTGRTTAPA	9,6	0,8093	(Antigen)
2.	PPVIRVKNFQTVPRP	12,0	0,8665	(Antigen)
3.	IDQVFGANPLEKLYK	17,0	-0,0124	(Non-Antigen)
4.	VKNFQTVPRPSQKSL	18,0	0,6779	(Antigen)
5.	YDHLVISTGRTTAPA	9,6	0,8093	(Antigen)

Keterangan : Epitop berwarna merupakan epitop terpilih yang akan maju keprediksi selanjutnya.

Pemilihan epitop sebagai kandidat vaksin berdasarkan pada 5 skor teratas (percentile rank) mengacu pada referensi bahwa ikatan akan semakin baik jikalau percentile rank semakin kecil (Rezaldi et al., 2021). Epitop terpilih tersebut lalu diuji antigenitasnya, hasil menunjukkan epitop nomor 3 pada Tabel 6 tidak dapat maju keprediksi selanjutnya dikarenakan tidak dapat memicu antigenitas. Dapat disimpulkan 5 epitop MHC-I dan 4 epitop MHC-II dapat dijadikan sebagai kandidat

pada epitop desain vaksin dan diprediksi ketahap berikutnya.

Selanjutnya tahap penambatan antara alel dan epitop pada MHC. Namun, dikarenakan masing-masing epitop masih dalam bentuk urutan asam amino artinya harus dilakukan prediksi struktur 3D terlebih dahulu. Epitop MHC-I dan MHC-II terpilih diprediksi struktur 3Dnya pada PEP-FOLD3 dengan hasil disajikan pada Tabel 7 dan 8.

Tabel 7. Struktur 3D epitop MHC-I

No	Epitop MHC-I	Struktur 3D
1.	TLSEVTTRV	
2.	RTFDAFLGV	

No	Epitop MHC-I	Struktur 3D
3.	QLHEITPVL	
4.	RQLHEITPV	
5.	FLGVVPPVI	
6	RTTAPAAAF	

Tabel 8. Struktur 3D epitop MHC-II

No	Epitop MHC-II	Struktur 3D
1.	YDHLVISTGRTTAPA	
2.	PPVIRVKNFQTVPRP	

No	Epitop MHC-II	Struktur 3D
3.	IDQVFGANPLEKLYK	
4.	VKNFQTVPRPSQKSL	

4. Prediksi Epitop Sel B

Prediksi epitop sel B pada IEDB dengan beberapa model, hasil disajikan pada Tabel 9.

Epitop sel B hasil prediksi yang diuji lebih lanjut merupakan epitop dengan length 12 mer, ini sesuai dengan (Firmansyah et al., 2021).

Berdasarkan Tabel 9, dari 31 epitop sel B hanya 4 epitop terpilih yang sesuai persyaratan yaitu pada prediksi model *Bepipred Linear Epitope*, *Emini Surface Accessibility* dan *Kolaskar and Tangaonkar* akan maju keprediksi berikutnya. Menurut Syakuran, 2020 Metode prediksi *Kolaskar and Tangaonkar* memberikan akurasi kurang lebih 75% dan menjadi metode yang paling umum digunakan dalam prediksi sel B.

Tabel 9. Prediksi epitop Sel B

No	Model	Start	End	Peptide	Length
1.	<i>Bepipred Linear Epitope</i>	7	7	MQ	2
		19	19	VP	2
		24	24	VFG	3
		36	36	RRKPKGTVG	9
		55	55	ATSTDD	6
		84	84	S	1
		88	88	S	1
		91	91	S	1
		139	139	GRTTAPAAA	9
		153	153	NEHGVPPPQPAI	12
		173	173	QACS	4
		180	180	MVKNATTTDAADK	12
		201	201	ETFSKPNLS	9
		222	222	PGNNT	5
		240	240	YKSGKSG	7
		258	258	EGENAQA	7
		290	290	QTVPRPSQKSLRAVPPNPTID	21
		319	324	SEQGET	6
2.	<i>Emini Surface Accessibility</i>	3	10	DSSYMQQV	8
		29	40	PLEKLYKRRKPK	12
		187	192	DAADKM	6
		201	209	ETFSKPNLS	9
		291	299	TVPRPSQKS	9
		303	309	VPPNPTI	7
		318	323	SSEQGE	6
3.	<i>Kolaskar and Tongaonkar</i>	44	53	GLQCSPCLMS	10
		64	71	DQLIVKRT	8
		73	79	ADLLPI	7
		131	137	YDHLVIS	7
		145	150	AAAFDA	6
		157	163	VPPPQPA	7
		167	175	DLGVAQQAC	9
		211	220	KDLALLLFTH	10
		228	239	FHILAQVLSKIA	12
		249	256	LDAFHQIL	8
		276	286	FLGVVPPVIRV	11
		300	306	LRAVPPN	7
		312	319	GWVCVYSS	8

Keterangan : Epitop berwarna merupakan epitop terpilih yang akan maju pada prediksi selanjutnya.

Tabel 10. Prediksi antigenisitas, toksisitas dan alergenitas epitop Sel B terpilih.

No	Epitop Linear Sel B	Length	Antigenitas	Toksisitas	Alergenitas
1.	NEHGVPPPQPAI	12	0,4751	Non-Toxic	Non-Allergen
2.	MVKNATTTDAADK	12	0,1225	Non-Toxic	Non-Allergen
3.	PLEKLYKRRKPK	12	-0,2108	Non-Toxic	Non-Allergen
4.	FHILAQVLSKIA	12	0,3397	Non-Toxic	Non-Allergen

Keterangan : Epitop berwarna merupakan epitop terpilih yang akan maju pada prediksi selanjutnya.

Selanjutnya epitop Sel-B terpilih dilakukan pengujian Prediksi Antigenitas, Toksisitas dan Alergenitas, hasil dapat dilihat pada Tabel 10.

Hasil uji pada Tabel 10 menunjukkan 4 epitop lulus dalam prediksi antigenitas dan toksisitas, tetapi hanya 1 epitop terpilih yang dapat menjadi kandidat epitop sel B pada desain vaksin. Karena 1 epitop lainnya dapat memicu alergen. Sesuai dengan referensi menurut (Rezaldi et al., 2021). Alergenitas ialah kemampuan suatu bahan yang dapat memicu sifat alergi. Sehingga

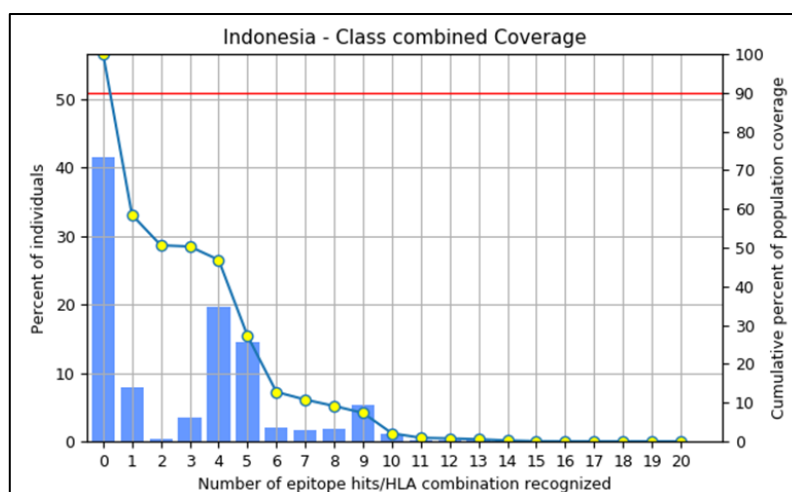
hasil alergenitas haruslah *Non-Allergen* dan bersifat *Non-Toxic*.

5. Prediksi *population coverage*

Prediksi ini dilakukan dengan populasi Indonesia, Gabungan antara 5 epitop pada MHC-I dan 4 Epitop pada MHC-II beserta alelnya diinputkan pada server sehingga didapatkan hasil yang disajikan pada Tabel 11 dan Gambar 1.

Tabel 11 Hasil prediksi *populatin coverage*

MHC class	Coverage (%)
<i>combined</i>	58,47%



Gambar 1. Hasil Prediksi *Population Coverage* di Indonesia

Hasil Population Coverage pada Gambar 1 ditunjukkan oleh titik kuning pada puncak tertinggi grafik dengan hasil tidak memenuhi persyaratan dikarenakan berdasarkan IEDB-AR hasil yang memenuhi persyaratan berada pada range >90% sesuai dengan batas tanda merah pada grafik. Menurut (Ong et al., 2020). *Population Coverage* ini dilakukan untuk

mengetahui cakupan antara interaksi epitop dengan cakupan alel MHC-I dan MHC-II, sehingga fluktuasi dalam distribusi alel pada setiap wilayah geografis berbeda. Pemilihan epitop, alel HLA MHC-I dan MHC-II sangat penting dan dipertimbangkan sehingga perlu referensi pemilihan alel untuk mencakup berbagai variasi genetik pada manusia sehingga

cakupan populasi yang didapatkan maksimal. Selaras dengan hal tersebut (Firmansyah et al., 2021), memaparkan "Tingkat keragaman molekul MHC (HLA) yang tinggi menyebabkan variasi dalam pengenalan antigen pada setiap individu. Akibatnya, vaksin yang dirancang untuk merangsang respons imun terhadap antigen tertentu pada satu populasi mungkin tidak efektif pada populasi lain yang memiliki susunan HLA berbeda. Untuk mengatasi hal ini, perlu dilakukan penelitian yang lebih mendalam mengenai distribusi alel HLA pada berbagai populasi sehingga dapat dirancang vaksin yang lebih optimal.

Cakupan populasi sebesar 58,47% yang diperoleh dalam studi ini menunjukkan bahwa desain vaksin saat ini belum mampu mencakup mayoritas populasi Indonesia secara efektif. Hal ini menjadi perhatian serius dalam pengembangan vaksin praktis, karena keberhasilan imunisasi pada skala luas sangat bergantung pada kemampuan vaksin untuk merangsang respon imun adaptif pada sebagian besar individu. Keragaman alel HLA di setiap populasi merupakan tantangan utama dalam desain vaksin berbasis epitop, sebab setiap individu memiliki kombinasi alel yang unik. Population coverage yang rendah mengindikasikan bahwa kombinasi epitop dan alel MHC-I dan MHC-II yang

digunakan belum sepenuhnya representatif terhadap distribusi HLA yang dominan di Indonesia. Implikasi dari hal ini adalah risiko rendahnya efektivitas vaksin dalam skenario dunia nyata, terutama jika diterapkan secara luas tanpa penyesuaian.

Untuk mengatasi keterbatasan ini, beberapa strategi dapat diterapkan. Pertama, pemilihan alel HLA perlu disesuaikan dengan distribusi HLA yang paling umum dalam populasi target, yang datanya dapat diperoleh melalui Allele Frequency Net Database (AFND) atau survei genetik lokal. Kedua, penting untuk memasukkan epitop yang bersifat promiscuous, yakni epitop yang dapat dikenali oleh berbagai tipe HLA, guna memperluas jangkauan cakupan populasi. Ketiga, pendekatan desain multi-epitop yang menggabungkan beberapa epitop dari protein lain selain VP35 berpotensi meningkatkan diversitas antigenik dan respons imun yang lebih luas. Terakhir, pendekatan vaksin regional juga dapat dipertimbangkan, yaitu dengan merancang vaksin spesifik untuk kelompok populasi dengan distribusi HLA yang serupa. Dengan penerapan strategi ini, desain vaksin dapat dioptimalkan untuk menghasilkan cakupan populasi yang lebih tinggi dan meningkatkan potensi keberhasilannya di masa depan.

6. Integrasi Epitop Kandidat Vaksin

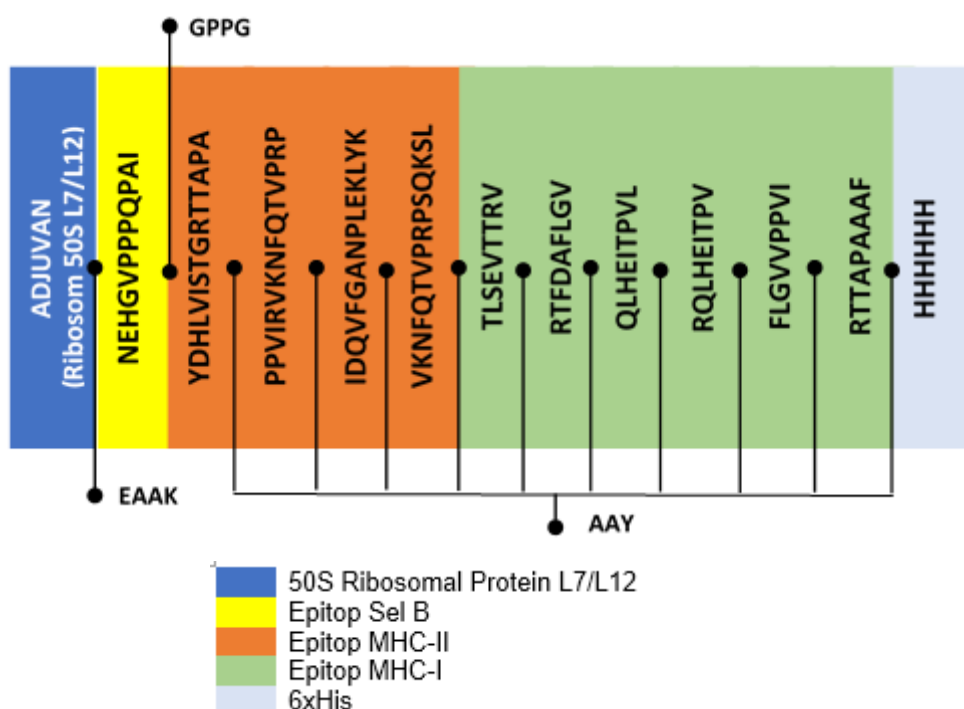
Berdasarkan hasil seleksi berlapis terhadap parameter antigenisitas, imunogenisitas, toksisitas, dan afinitas MHC, diperoleh sejumlah epitop final yang dinilai layak untuk dikembangkan sebagai kandidat vaksin. Lima epitop dari MHC kelas I (TLSEVTTRV, RTFDAFLGV, QLHEITPVL, RQLHEITPV, FLGVVPPVI) dan empat epitop dari MHC kelas II (YDHLVISTGRTTAPA, PPVIRVKNFQTVPRP, VKNFQTVPRPSQKSL, serta RTTAPAAAF) lolos seluruh tahapan seleksi berbasis *in silico*. Selain itu, satu epitop sel B linear (NEHGVPPPQPAI) juga dipilih karena memenuhi kriteria antigenik, non-toksik, dan non-alergen.

Integrasi antara epitop sel T CD8+, sel T CD4+, dan sel B berpotensi menciptakan respons imun yang lebih kuat dan seimbang, baik dalam jalur humoral maupun seluler. Epitop sel T CD8+ dapat mengaktivasi limfosit sitotoksik untuk menghancurkan sel terinfeksi, sedangkan epitop sel T CD4+ berperan dalam membantu aktivasi sel B dan meningkatkan memori imun. Sementara itu, epitop sel B merangsang produksi antibodi spesifik terhadap virus. Potensi sinergi antarepitop ini diharapkan dapat menghasilkan

imunitas protektif yang optimal terhadap infeksi virus Marburg.

Untuk menyatukan semua epitop tersebut dalam satu konstruksi vaksin multiepitope, digunakan pendekatan rekayasa dengan penambahan linker spesifik, seperti GP GPG untuk menghubungkan epitop sel T helper dan epitop sel B, serta AAY untuk menghubungkan epitop sel T sitotoksik. Di bagian N-terminal ditambahkan adjuvan 50S ribosomal protein L7/L12 yang berfungsi sebagai agonis TLR4 guna meningkatkan presentasi antigen dan respons imun. Selain itu, ditambahkan pula ekor 6xHis pada C-terminal untuk memudahkan pemurnian protein dalam aplikasi laboratorium. Kombinasi ini membentuk struktur vaksin multiepitope yang dirancang secara sistematis guna mengoptimalkan stabilitas, ekspresi, dan daya imunogenik dari kandidat vaksin berbasis epitop VP35.

Maka dalam menyusun vaksin yang dikonstruksi dengan beberapa penambahan seperti adjuvan yang digunakan yaitu Ribosom 50s L7/L12 dan Linkers. Rancangan vaksin dikonstruksi berdasarkan urutan pada (Syakuran, 2020), dimana ditunjukkan pada Gambar 2.



Gambar 2. Diagram Hasil Kontruksi Desain Vaksin

Adjuvan yang digunakan ialah 50S Ribosomal Protein L7/L12, menurut Syakuran, 2020 adjuvan dalam vaksin dapat berfungsi untuk meningkatkan antigenisitas. Protein 50S Ribosomal Protein L7/L12 memiliki potensi sebagai adjuvan berdasarkan sejumlah studi, Selain itu kelebihan protein ini merupakan aponis dari TLR4 yang dipercaya memiliki potensi sebagai adjuvan dengan memicu peningkatan penyajian antigen oleh Antigen-Presenting Cell (APC) TLR lain juga dapat berinteraksi dengan protein ini.

Menurut (Kar et al., 2020) Penggunaan linker kaya glisin seperti GPPG dapat Meningkatkan kelarutan,

Adapun kelebihan dalam penggunaan linker AAY dan hal utama dalam konstruksi vaksin multiepitop, kelebihan lainnya yaitu dapat GPPG yaitu mencegah pembentukan sambungan antar epitop yang merupakan meningkatkan imunogenisitas dan penyajian epitop (Qamar et al., 2020), 6xHis HHHHHH pada C-terminus, menurut (Naveed et al., 2021) ini merupakan residu histidine yang dapat mengikat immobilized ions sehingga memudahkan sekuens bekerja saat dalam kondisi buffer, Adapun sekuens lengkap desain vaksin beserta hasil Visualisasi 3D di tunjukkan pada Gambar 3.

MSITKDQIEAVAAMSVMDEVVELISAMEEKFGVSAAA AVAAGPVEAAE
 EKTEFDVILKAAGANKVAVIKAVRGATGLGLKEAKDLVESAPAALKEGVS
 KDDAEALKKALEEAGAEVEVK EAAKNEHGVPPPQPAI GPPGYDHLVIST
 GRTTAPAAAYPPVIRVKNFQTVPRP AAYIDQVFGANPLEKLYKAAYVKNFQ
 TVPRPSQKSLAAYTLSEVTTRVAAYRTFDAFLGV AAYQLHEITPVL AAYRQ
 LHEITPV AAYFLGVVPPVI AAYRTTAPAAAF AAYHHHHHHH

(a)



Gambar 3. Sekuens desain vaksin (a) dan Visulisasi 3D desain vaksin Warna pelangi dari ungu (N-terminus) hingga merah (C-terminus) (b)

Kontruksi vaksin pada Gambar 2 diurutkan sesuai diagram skematik, sehingga didapatkan sekuens sesuai Gambar 3 pada poin (a). Sedangkan Visualisasi desain vaksin menggunakan tr-Rosetta didapatkan struktur 3D sesuai pada poin (b), Urutan bagian yang berwarna ungu merupakan adjuvan, sedangkan pada urutan terakhir merah merupakan 6xHis atau residu histidine.

7. Analisis struktur primer, sekunder, tersier dan validasi

Analisis struktur primer dengan BLASTp menunjukkan tidak adanya persamaan yang signifikan terhadap protein pada manusia/non-homolog dan ini hasil yang sangat baik menurut (Rawal et al.,

2021) bahwa hasil BLASTp tidak boleh sama dengan protein pada manusia untuk menghindari adanya autoimunitas. Selanjutnya desain vaksin dianalisis sifat fisikokimia dengan webserver Protparam, Vaksin hasil kontruksi terdiri dari 291 asam amino. Adapun komposisi asam amino tersebut terdiri dari Ala (A) 59, Arg (R) 9, Asn (N) 5, Asp (D) 9, Gln (Q) 8, Glu (E) 22, Gly (G) 15, His (H) 10, Ile (I) 13, Leu (L) 18, Lys (K) 19, Met (M) 4, Phe (F) 9, Pro (P) 21, Ser (S) 10, Thr (T) 16, Tyr (Y) 12, Val (V) 32,

Berat molekul desain vaksin 30767,32 Da, Berat molekul tersebut lebih kecil jika dibandingkan dengan desain vaksin (Naveed et al., 2021) yaitu 32928,31

Da dengan jumlah asam amino sebanyak 309.

Nilai theoretical pl (*Isodesoic point*) yaitu 6,37 diperkirakan bermuatan nol, tetapi pada struktur desain vaksin diprediksi stabil dengan instability index 35,24. Sesuai dengan (Naveed et al., 2021) instability indeks diprediksi stabil dengan jumlah <40, Aliphatic index 93,71 dan Grand Average of Hydropathicity (GRAVY) 0,087. Menurut (Sanami et al., 2021) GRAVY bernilai negatif berarti desain vaksin bersifat hidrofilik, Sehingga GRAVY hasil desain vaksin kali ini bersifat hidrofobik, seperti pada (Qamar et al., 2020).

Pengujian selanjutnya ialah alergenitas, antigenitas dan toksisitas

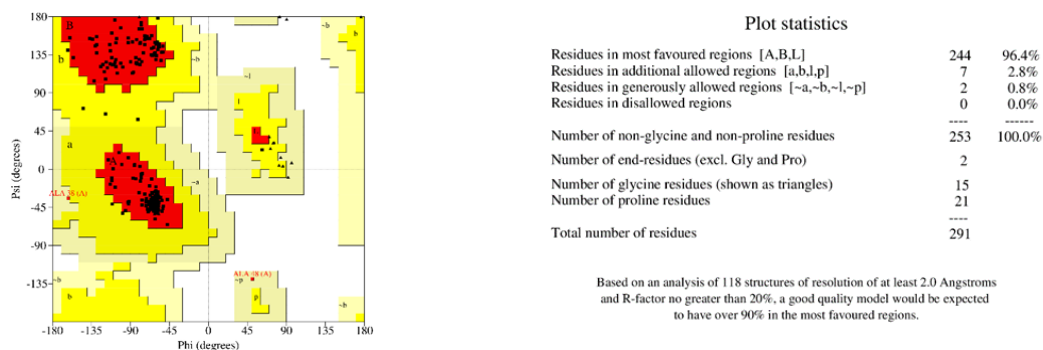
desain vaksin. Di dapatkan *Non-Allergen*, sedangkan nilai antigenisitasnya 0,5071 dengan keterangan antigen, serta non-toxin, Ini memenuhi seluruh persyaratan desain vaksin artinya desain vaksin memicu antigen, tidak memicu alergi dan tidak beracun untuk manusia. Analisis struktur sekunder desain vaksin didapatkan terdiri dari 179 jumlah asam amine Alpha helix (hh) dengan 61,51%, 18 asam amino Extended strand (Ee) dengan 6,19%, 17 asam amino //-turn (Tt) dengan 5,84% dan Random coil (CC) sebanyak 77 asam amino dengan 26,46%. Analisis struktur tersier desain vaksin menggunakan web server GalaxyRefine2, RMSD didapatkan 1,211 Å dengan struktur pada Gambar 4.



Gambar 4. Hasil 3D desain vaksin dalam struktur tersier

Analisis *Ramachandran Plot* *Analysis* desain vaksin menggunakan web server ERRAT2 PROCHECK dengan Job

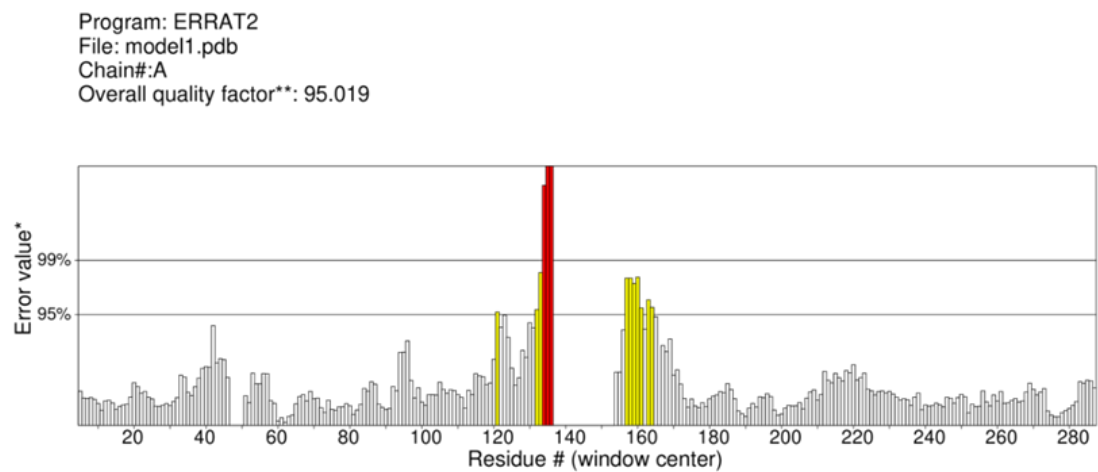
ID 1685799, Hasil disajikan pada Gambar 5.



Gambar 5. Hasil *Ramachandran Plot Analysis* desain vaksin

Hasil menunjukkan Residu pada *most favoured regions* (daerah yang disukai) sebanyak 96,4%, *additional allowed regions* 2,8% dan *disallowed regions* (daerah yang tidak disukai) 0,0%. Struktur dianggap baik jika residu asam amino pada *most favoured region* lebih dari 90% (Renadi et al., 2023). Selain itu, PROCHECK model *Ramachandran Plot Analysis* desain vaksin menunjukkan 0 error, dengan hasil memenuhi persyaratan.

Validasi struktur menggunakan ERRAT2 dengan Job ID 1685799 didapatkan hasil 95,019%, disajikan pada Gambar 6.



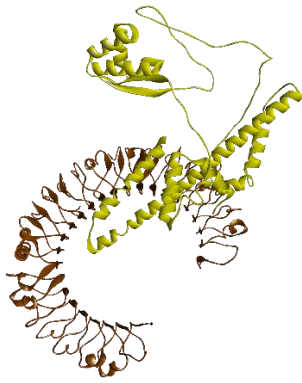
Gambar 6. Hasil validasi struktur desain vaksin

Desain vaksin pada referensi Syakuran, 2020 Hasil validasi ERRAT memiliki nilai kualitas cukup baik yaitu 79,268. Kualitas model struktur yang lebih baik memiliki nilai kualitas yang lebih tinggi. Berdasarkan hal tersebut, desain vaksin kali ini memiliki kualitas sangat baik.

8. Analisis interaksi antara desain vaksin dengan sistem imun

Analisis penambatan molekuler Desain vaksin dengan reseptor yang bekerja sebagai sistem imun menggunakan PyDOCK, Disajikan pada Tabel 12.

Tabel 12 Analisis interaksi antara desain vaksin dengan sistem imun

No	Sistem Imun	Interkasi 3D antara Desain Vaksin dengan Sistem Imun	Total Score
1.	TLR3		-43,698 (<i>Electrostatics</i> = -14,946) (<i>Desolvation</i> = -29,484) (<i>VdW</i> = 7,322)D

No	Sistem Imun	Interkasi 3D antara Desain Vaksin dengan Sistem Imun	Total Score
2.	HLA-A 11*01		-42,192 (Electrostatics=-20,034) (Desolvation=-20,749) (VdW= -14,085)
3.	HLA-DR1		-51,899 (Electrostatics=-23,071) (Desolvation=-34,896) (VdW= 60,685)

Keterangan : Desain Vaksin (Kuning) dan Sistem Imun (Coklat)

Reseptor yang digunakan yaitu sistem imun, masing-masing ditambahkan dengan desain vaksin yang berperan sebagai ligan, Hasil didapatkan seluruh total score dari masing-masing interaksi antara desain vaksin dengan sistem imun menunjukkan hasil yang baik.

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian terhadap kandidat protein VP35, perancangan dan simulasi desain vaksin peptida VP35 yang divisualisasikan dalam bentuk 3D melalui

server tr-Rosetta dan divalidasi menggunakan ERRAT2 menunjukkan kualitas struktur yang baik (95,019%). Desain vaksin memiliki interaksi yang stabil secara in silico dengan reseptor sistem imun TLR3, MHC-I (HLA-A*11:01), dan MHC-II (HLA-DR1).

Meskipun demikian, penelitian ini memiliki beberapa keterbatasan yang perlu diperhatikan. Selain cakupan populasi yang masih rendah (58,47%), keterbatasan lain meliputi: (1) penggunaan hanya satu protein target, yaitu VP35, sehingga potensi

imunogenisitas dari protein lain belum dieksplorasi; (2) seluruh analisis dilakukan secara *in silico* tanpa adanya validasi eksperimental *in vitro* maupun *in vivo*; dan (3) analisis potensi cross-reactivity dengan protein manusia belum dilakukan secara mendalam, yang penting untuk mengantisipasi risiko autoimunitas atau reaktivitas tak diinginkan.

Oleh karena itu, penelitian lanjutan disarankan untuk: (i) mengintegrasikan alel HLA yang lebih representatif terhadap distribusi populasi target; (ii) mengeksplorasi protein target tambahan untuk meningkatkan diversitas antigenik; (iii) melakukan validasi *in vitro* dan *in vivo* untuk memastikan keamanan, imunogenisitas, dan efektivitas protektif; serta (iv) melakukan analisis cross-reactivity secara komprehensif sebelum pengembangan menuju uji klinis pada manusia.

DAFTAR PUSTAKA

- Abir, M. H., Rahman, T., Das, A., Etu, S. N., Nafiz, I. H., Rakib, A., Mitra, S., Emran, T. Bin, Dhama, K., Islam, A., Siyadatpanah, A., Mahmud, S., Kim, B., & Hassan, M. M. (2022). Pathogenicity and virulence of Marburg virus. *Virulence*, 13(1), 609–633.
- <https://doi.org/10.1080/21505594.2022.2054760>
- Bibi, S., Ullah, I., Zhu, B., Adnan, M., Liaqat, R., Kong, W. B., & Niu, S. (2021). *In silico* analysis of epitope-based vaccine candidate against tuberculosis using reverse vaccinology. *Scientific Reports*, 11(1), 1–16. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-80899-6>
- Firmansyah, M. A., Susilo, A., Haryanti, S., & Herowati, R. (2021). Desain Vaksin Berbasis Epitop dengan Pendekatan Bioinformatika untuk Menekan Glikoprotein Spike SARS-CoV-2. *Jurnal Farmasi Indonesia*, 18, 82–96. <https://doi.org/10.31001/jfi.v18i2.1351>
- Kar, T., Narsaria, U., Basak, S., Deb, D., Castiglione, F., Mueller, D. M., & Srivastava, A. P. (2020). A candidate multi-epitope vaccine against SARS-CoV-2. *Scientific Reports*, 10(1), 1–24. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-67749-1>
- Khairkhah, N., Aghasadeghi, M. R., Namvar, A., & Bolhassani, A. (2020). Design of novel multiepitope constructs-based peptide vaccine against the structural S, N and M proteins of human COVID-19 using immunoinformatics analysis. *PLoS ONE*, 15(10 October), 1–28.

- https://doi.org/10.1371/journal.pone.0240577
- Khasana, A. S. N., Hartono, N. L. S., Permatasari, V. O., Ramadhan, D. L., & Sumadi, F. A. N. (2023). in Silico Design of B-Cell Epitope Based Peptide Vaccine for Varicella Zoster Virus. *Indonesian Journal of Biotechnology and Biodiversity*, 7(1), 1–11.
https://doi.org/10.47007/ijobb.v7i1.157
- Mahmud, S. M. N., Rahman, M., Kar, A., Jahan, N., & Khan, A. (2019). Designing of an Epitope- Based Universal Peptide Vaccine against Highly Conserved Regions in RNA Dependent RNA Polymerase Protein of Human Marburg Virus: A Computational Assay. *Anti-Infective Agents*, 18(3), 294–305.
https://doi.org/10.2174/2211352517666190717143949
- Naveed, M., Tehreem, S., Arshad, S., Bukhari, S. A., Shabbir, M. A., Essa, R., Ali, N., Zaib, S., Khan, A., Al-Harrasi, A., & Khan, I. (2021). Design of a novel multiple epitope-based vaccine: An immunoinformatics approach to combat SARS-CoV-2 strains. *Journal of Infection and Public Health*, 14(7), 938–946.
https://doi.org/10.1016/j.jiph.2021.04.010
- NetCTL. (2023). *NetCTL-1.2 Prediction of CTL epitopes in protein sequences*. DTU Health Tech.
https://services.healthtech.dtu.dk/services/NetCTL-1.2/
- Ong, E., He, Y., & Yang, Z. (2020). Epitope promiscuity and population coverage of Mycobacterium tuberculosis protein antigens in current subunit vaccines under development. *Infection, Genetics and Evolution*, 80(January), 104186.
https://doi.org/10.1016/j.meegid.2020.104186
- Rawal, K., Sinha, R., Abbasi, B. A., Chaudhary, A., Nath, S. K., Kumari, P., Preeti, P., Saraf, D., Singh, S., Mishra, K., Gupta, P., Mishra, A., Sharma, T., Gupta, S., Singh, P., Sood, S., Subramani, P., Dubey, A. K., Strych, U., ... Bottazzi, M. E. (2021). Identification of vaccine targets in pathogens and design of a vaccine using computational approaches. *Scientific Reports*, 11(1), 1–25.
https://doi.org/10.1038/s41598-021-96863-x
- Renadi, S., Pratita, A. T. K., Mardianingrum, R., & Ruswanto, dan R. (2023). The Potency of Alkaloid Derivates as Anti-Breast Cancer Candidates: In Silico

- Study. *Jurnal Kimia Valensi*, 9(1), 89–108.
<https://doi.org/10.15408/jkv.v9i1.31481>
- Rezaldi, F., Taupiqurohman, O., Fadillah, M. F., Rochmat, A., Humaedi, A., & Fadhilah, F. (2021). Identifikasi Kandidat Vaksin COVID-19 Berbasis Peptida dari Glikoprotein Spike SARS CoV-2 untuk Ras Asia secara In Silico. *Jurnal Biotek Medisiana Indonesia*, 10(1), 77–85.
<https://ejournal2.litbang.kemkes.go.id/index.php/jbmi/article/view/5031/2299>
- Ruswanto, R., Mardianingrum, R., Nofianti, T., Fizriani, R., & Siswandono, S. (2023). Computational Study of Bis-(1-(Benzoyl)-3-Methyl Thiourea) Platinum (II) Complex Derivatives as Anticancer Candidates. *Advances and Applications in Bioinformatics and Chemistry*, 16(January), 15–36.
<https://doi.org/10.2147/AABC.S392068>.
- Sakabe, S., Sullivan, B. M., Hartnett, J. N., Robles-Sikisaka, R., Gangavarapu, K., Cubitt, B., ... & Oldstone, M. B. (2018). Analysis of CD8⁺ T cell response during the 2013–2016 Ebola epidemic in West Africa. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 115(32), E7578–E7586.
- Sanami, S., Alizadeh, M., Nosrati, M., Dehkordi, K. A., Azadegan-Dehkordi, F., Tahmasebian, S., Nosrati, H., Arjmand, M. H., Ghasemi-Dehnoo, M., Rafiei, A., & Bagheri, N. (2021). Exploring SARS-COV-2 structural proteins to design a multi-epitope vaccine using immunoinformatics approach: An in silico study. *Computers in Biology and Medicine*, 133(January), 104390.
<https://doi.org/10.1016/j.compbiomed.2021.104390>
- Syakuran, L. "Abdan. (2020). Desain Kandidat Vaksin SARS-CoV-2 Menggunakan Pendekatan Immunoinformatika. *ResearchGate*, 1–11.
<https://doi.org/10.13140/802.2.33453.31202>.
- Tahir ul Qamar, M., Rehman, A., Tusleem, K., Ashfaq, U. A., Qasim, M., Zhu, X., Fatima, I., Shahid, F., & Chen, L. L. (2020). Designing of a next generation multiepitope based vaccine (MEV) against SARS-COV-2: Immunoinformatics and in silico approaches. *PLoS ONE*, 15(12 December 2020), 1–25.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0244176>