

EVALUASI KONSTRUKSI DNA DA+LAM VEKTOR PLASMID BERKAITAN DENGAN EKSPRESI PROTEIN REKOMBINAN ROPHTRY-1 (ROP1) *TOXOPLASMA GONDII* PADA *ESCHERICIA COLI*

Purwaningtyas Kusumaningsih

Program Studi Ilmu Gizi, Fakultas Ilmu Kesehatan, Sains, dan Teknologi,
Universitas Dhyana Pura

Email: purwak.05@undhirabali.ac.id

ABSTRAK

Evaluasi terhadap konstruksi DNA pada vector plasmid yang membawa gen *rophtry-1 Toxoplasma gondii* dilakukan dengan tujuan untuk mengetahui faktor-faktor penyebab kegagalan ekspresi protein rekombinan Rophtry-1 (ROP1). Gen *rophtry-1* yang mengkode protein ROP1, dipotong dari plasmid rekombinan pGEMT/R1 menggunakan enzim restriksi *EcoRI* dan diligasi ke plasmid pET32a(+) untuk diekspresikan. Plasmid ditransformasi ke dalam bakteri *Escherichia coli* (BL21). Plasmid rekombinan dianalisis dengan metode polymerase chain reaction (PCR) untuk menentukan klon positif. Analisis sekuensing DNA dilakukan untuk mengetahui proses ekspresi gen didalam plasmid. Hasil amplifikasi DNA dengan PCR diperoleh fragmen DNA sebesar yang diperkirakan yaitu 1.51 kbp dan 2.10 kbp. Fragmen gen penyandi protein ROP1 berhasil di subklon pada pET32a(+) pada *E. coli* BL21, tetapi tidak dapat diekspresikan karena terjadi pergeseran pembacaan kodon, sehingga menghasilkan dua *premature* stop kodon (TGA) sebelum memasuki start kodon (ATG) gen penyandi protein ROP1.

Kata kunci: cloning, ekspresi gen, *frame shift*

ABSTRACT

Evaluation on the DNA construction on plasmid vector contains Toxoplasma gondii rophtry-1 gene was to determine the factors causing failure on Rophtry-1 (ROP1) recombinant protein expression. The rophtry-1 gene encoding the ROP1 protein was cleavage from the pGEMT/R1 recombinant plasmid using the EcoRI restriction enzyme and ligation to the pET32a(+) plasmid to expressed. Plasmids are transformed into Escherichia coli (BL21). Recombinant plasmids were analyzed by polymerase chain reaction (PCR) method to determine positive clones. DNA sequencing analysis was carried out to determine the gene expression process in the plasmid. The results of DNA amplification by PCR obtained DNA fragments as of the expected size i. e. 1.51 kbp and 2.10 kbp. The gene fragment encoding rophtry-1 protein was successfully subcloned on pET32a (+) in E. coli BL21, but could not be expressed because there was a shift in the codon reading, resulting in two premature stop codons (TGA) before entering the start codon (ATG) of the ROP1 protein coding gene.

Keywords: cloning, gene expression, *frame shift*

1. Pendahuluan

Kloning gen merupakan suatu teknik yang digunakan dalam penelitian DNA dan ekspresi protein. Teknologi yang dilakukan bertujuan untuk menggandakan gen spesifik yang ditargetkan dengan menggunakan suatu vektor disebut plasmid atau mengekspresikan protein spesifik, yang disebut protein rekombinan (Souii et al., 2013).

Tujuan dari Kloning gen adalah untuk menghasilkan protein rekombinan yang bersifat spesifik, murni dan dapat diproduksi dalam jumlah besar. Sehingga yang dihasilkan adalah suatu protein tunggal yang selanjutnya dapat digunakan sebagai bahan dasar pengembangan alat diagnostik, produksi enzim dan pembuatan vaksin rekombinan (Nurjayadi et al., 2016).

Subkloning merupakan proses pemindahan gen target, kepada vektor kedua yang pada penelitian ini adalah vektor plasmid ekspresi dari vektor plasmid cloning. perbedaannya vektor plasmid cloning hanya digunakan untuk menggandakan gen target yang kita inginkan disebut juga *high copy number plasmid*. Kemudian dipindahkan ke vektor plasmid ekspresi untuk memproduksi protein target. Gen target didalam vektor plasmid ekspresi pET-32a(+) yang ditransformasikan ke dalam bakteri *Eschericia coli* BL21(D3) akan diekspresikan oleh promoter lacI dengan diinduksi oleh *Isopropyl-1-thio-β-D-galactosidase* (IPTG), menyebabkan RNA Polimerase T7 yang ditranskrip oleh *E. coli*, menempel pada T7 promoter plasmid, sehingga produksi protein dapat dikontrol terutama untuk protein yang bersifat toksik, yang dapat menyebabkan kematian bakteri rekombinan (Chambers et al., 2009). Kelengkapan factor-faktor yang mempengaruhi proses transkripsi dan translasi perlu diperhatikan sehingga hasil protein target yang diinginkan dapat dihasilkan (Esposito et al., 2009).

Pada penelitian ini dilakukan evaluasi pada gen DNA target yaitu gen penyandi protein Rophtry-1 untuk melihat kelengkapan komponen-komponen yang mendukung ekspresi protein dan kelengkapan pembacaan tiga-tiga nukleotida yang mengkode protein ROP-1 dan proses pembacaan tiga-tiga nukleotida setelah berada di dalam vektor plasmid ekspresi pET-32a(+), yang dimulai dari pembacaan nukleotida protein penyandi protein fusi dan protein komplemen lainnya yang terdapat didalam plasmid guna menunjang dalam memperoleh protein rekombinan murni. Evaluasi dilakukan untuk mengetahui apakah protein Rophtry-1 dapat diekspresikan di dalam bakteri *E. coli* BL21(D3).

2. Metode

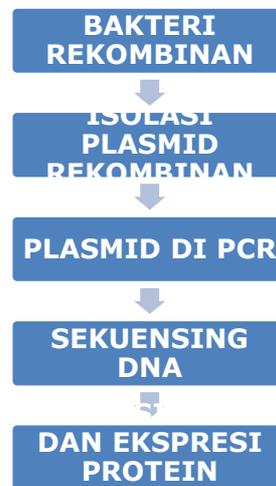
Bahan Penelitian

Bahan DNA yang dievaluasi pada penelitian ini adalah plasmid rekombinan p-ET32a(+)/R1 yang didalamnya terdapat DNA insert gen *rop1* yang mengkode protein Rophtry 1 *Toxoplasma gondii*, hasil subcloning dengan memotong gen DNA *rop1* menggunakan enzim restriksi EcoR I dari plasmid rekombinan pGEMT-Easy/R1 dan diligasi ke vektor plasmid ekspresi p-ET32a(+), diperoleh dengan mengisolasi dari bakteri rekombinan *Eschericia coli* BL21(D3).

Primer forward R1F1 dan R1R2, primer yang digunakan pada penelitian sebelumnya untuk mengamplifikasi gen *rop1* dari takizoit *T. gondii*. Primer T7 promoter, primer bawaan dari vektor ekspresi pET-32a(+).

Cara Penelitian

Alur penelitian dapat dilihat pada Gambar 1 di bawah ini:



Gambar 1. Alur Penelitian

Jalan Penelitian Analisis Plasmid Rekombinan dan Ekspresi Protein Rekombinan Isolasi plasmid pET-32a(+)/R1

Kultur bakteri rekombinan hasil biakan dalam medium LB cair ditampung dalam *microtube* (1,5 ml), kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 12.000 rpm selama 30 detik (*microfugeTM11*, Beckman) untuk mendapatkan pelet. Setelah supernatan dibuang, pelet yang diperoleh diresuspensi dengan 100 μ l *lysing solution* I (LS I) kemudian divortek sampai homogen dan diinkubasi dalam es selama 5 menit. Selanjutnya ditambahkan *lysing solution* II sebanyak 200 μ l (LS II), dan dicampur dengan cara membolak-balikkan tabung *microtube* sebanyak 5 kali dan diletakkan ke dalam *ice box* yang berisi es selama beberapa menit. Kemudian ditambahkan *lysing solution* III (LS III) sebanyak 150 μ l dan divortek selama 10 detik kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 12.000 rpm selama 5 menit dan ditaruh dalam es. Supernatan ditampung kedalam *microtube* baru kemudian ditambahkan larutan CIAA dan fenol dengan perbandingan 1:1 volume yang diperoleh dan divortek. Campuran disentrifugasi kembali selama 5 menit dengan kecepatan 12.000 rpm. Supernatan ditampung ke dalam *microtube* baru dan ditambahkan *ethanol absolute* dingin dua kali volume supernatan yang diperoleh. Semua tahap diatas dilakukan dalam kondisi dingin (dalam *ice box*). Kemudian dipresipitasi pada temperatur -20°C semalam. Hasil presipitasi disentrifugasi selama 5 menit dengan kecepatan 12.000 rpm hingga diperoleh pelet. Supernatan dibuang dan pelet ditambahkan larutan *ethanol 70%* dingin sebanyak 800 μ l, untuk membilas *ethanol absolute*. Setelah itu pelet dikeringkan dan ditambahkan TE (volume disesuaikan dengan banyak pelet) untuk melarutkan pelet. Plasmid p-ET32a(+)/R1 selanjutnya dielektroforesis pada agarose 1% dan diamati dibawah sinar ultraviolet.

Analisis Sekuensing plasmid pET-32a(+)/R1

Plasmid rekombinan selanjutnya dianalisis dengan menggunakan metode *Polymerase Chain Reaction* (PCR). Primer yang digunakan untuk mengamplifikasi gen penyandi protein ROP-1 adalah primer *foward* R1F1 (5` -

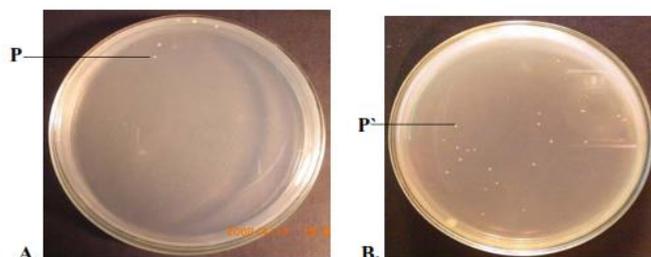
CGTGACATATACTGCACTGAC-3`), primer *reverse* R1R2 (5`-CATCTGCAAACCTCGATCAC-3`), dan T7 promoter (5`-TAATACGACTCACTATAGGG-3`). Primer diencerkan sehingga konsentrasi primer menjadi 10 pmol/ μ l sebelum digunakan.

Campuran reaksi pertama untuk proses amplifikasi dibuat dengan penambahan 3 μ l template plasmid rekombinan (pET-32a+)/R1, 2 μ l primer R1F1 dan 2 μ l primer R1R2 serta 18 μ l dH₂O filter ke dalam *pure Taq RTG-PCR* sehingga volume total menjadi 25 μ l. Reaksi kedua dibuat dengan penambahan 3 μ l template plasmid rekombinan (pET-32a+)/R1, 2 μ l primer T7 promoter dan 2 μ l primer R1R2 serta 18 μ l dH₂O filter ke dalam *pure Taq RTG-PCR* sehingga volume total menjadi 25 μ l. Tabung berisi campuran reaksi tersebut dimasukkan ke dalam *thermocycler* (*Gene Cycler*, Biorad) dan dijalankan dengan program sebagai berikut: (1) denaturasi awal dengan temperatur 94°C selama 5 menit, (2) denaturasi dengan temperature 94°C selama 1 menit, (3) *annealing* primer dengan temperatur 60°C selama 1 menit, (4) polimerisasi dengan temperatur 72°C selama 1 menit, (5) siklus diulang sehingga total siklus 35 kali, dan (6) diakhiri dengan polimerisasi tambahan pada temperatur 72°C selama 5 menit. Proses amplifikasi dikontrol menggunakan kontrol negatif menggunakan pET-32a(+) tanpa *insert* gen *rop-1*, yang diamplifikasi dengan primer yang sama. Produk PCR selanjutnya disekuensing dan dianalisa kerangka baca yang mentranslasi mRNA penyandi protein Rophtry-1.

3. Hasil dan Pembahasan

Isolasi Plasmid rekombinan

Plasmid rekombinan hasil ligasi gen *rop1* kedalam pET-32a(+) dan pET-32a(+) tanpa gen *rop1* sebagai kontrol negative, ditransformasi ke *E. coli* BL21(D3). Pada gambar 2., adalah bakteri rekombinan *E. coli* BL21(D3) diduga pembawa plasmid rekombinan pET-32a+)/R1 dan plasmid pET-32a(+). Bakteri *E. coli* tidak akan tumbuh jika tidak membawa plasmid karena plasmid rekombinan membawa gen penanda resisten terhadap ampicillin yang akan menyandi dan mengekspresikan enzim β -laktamase kedalam media yang mengandung ampicillin, dengan menghidrolisis ikatan cincin β -laktam untuk melindungi bakteri yang sensitive terhadap ampicillin sehingga dapat tumbuh (Sambrook and Russell, 2006). Isolasi plasmid rekombinan menggunakan teknik alkalis, kemudian dilanjutkan dengan *screening* plasmid, menggunakan metode *Polymerase Chain Reaction* (PCR) menggunakan 3 primer dengan 2 variasi reaksi.

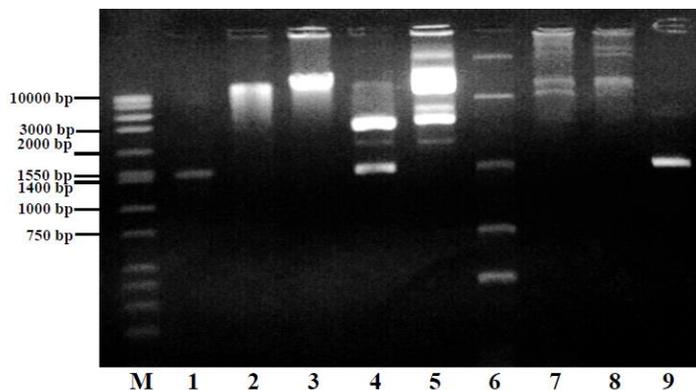


Gambar 2. Bakteri rekombinan pembawa plasmid rekombinan pET-32a+)/R1. Keterangan: Cawan A. P: Bakteri *E. coli* BL21(D3) hasil transformasi plasmid rekombinan pET-32a+)/R1. Cawan B. P': Bakteri *E. coli* BL21(D3) hasil transformasi plasmid tanpa insert pET-32a(+).

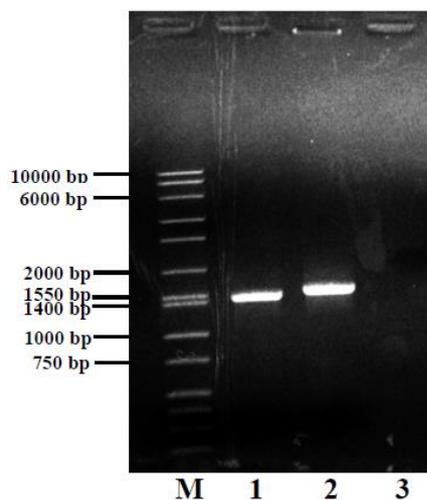
Analisis Plasmid Rekombinan pET-32a(+)/R1

Plasmid rekombinan yang diperoleh dilakukan *screening* menggunakan primer *forward* T7 promoter yang berasal dari pET-32a(+), primer R1F1 dan primer *reverse* R1R2. Plasmid rekombinan dari kultur koloni transformasi ditempatkan dalam dua *microtube*, satu *microtube* memakai primer *forward* T7 promoter (5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3') dan primer *reverse* R1R2 (5'-CATCGTCAAACCTCGATCAC-3'). Satu *microtube* lainnya plasmid diamplifikasi memakai primer *forward* R1F1 (5'-CGTGACATATACTGCACTGAC-3') dan primer *reverse* R1R2 (5'-CATCGTCAAACCTCGATCAC-3'). Amplifikasi ini bertujuan untuk mengetahui bahwa gen *rop-1* benar-benar terligasi dan posisi *insert* tidak terbalik. Langkah ini dilakukan karena pada saat ligasi hanya digunakan satu enzim pemotongan yaitu *EcoR* I untuk memotong daerah *multiple cloning site*.

Hasil amplifikasi plasmid rekombinan M1, kemudian dielektroforesis pada gel agarose 1%, dibandingkan dengan plasmid *uncut*, plasmid yang dipotong dengan *EcoR* I, hasil pemotongan pWTA-R1 menggunakan *EcoR* I, plasmid pET-32a(+) tanpa *insert* DNA ROP-1, dan hasil mikroelusi gen *rop-1*. Hasil elektroforesis ditunjukkan pada Gambar 3 dan 4.



Gambar 3. Hasil elektroforesis isolasi plasmid dan screening PCR. Keterangan: M: Marker; 6: Produk PCR pET-32a(+) tanpa insert gen *rop-1* dengan R1F1/R1R2.



Gambar 4. Hasil elektroforesisi PCR plasmid pET-32a(+)/R1. Keterangan: M: Marker; 1: Produk PCR pET-32a(+)/R1 dengan primer R1F1/R1R2; 2: Produk PCR pET-32a(+)/R1 dengan primer T7 promoter/R1R2.

Plasmid rekombinan koloni M1 yang dipotong dengan *EcoR* I setelah dielektroforesis tidak diperoleh pita linier DNA *insert* *rop-1* berukuran ± 1533 bp. Hal ini mungkin disebabkan plasmid tidak dapat terpotong secara sempurna atau

plasmid dalam konsentrasi rendah. Amplifikasi plasmid rekombinan koloni putih transformasi M1 dengan primer R1F1/R1R2 menghasilkan pita tunggal dengan ukuran ± 1513 bp, hampir sesuai dengan panjang ukuran DNA ROP-1 hasil pemotongan pWTA-R1 dengan enzim *EcoR* I yaitu ± 1533 bp karena ada penambahan ± 20 basa nukleotida dari pGEM®-T Easy. Plasmid pET-32a(+) yang tidak membawa gen *rop-1* setelah diamplifikasi dengan primer *foward* R1F1 dan primer *reverse* R1R2 menghasilkan pita yang tidak spesifik, hal ini menunjukkan bahwa ada beberapa sekuen nukleotida bersifat *complementary* yang dikenali oleh sekuens primer *foward* atau *reverse* (*mispriming*), dan diamplifikasi berulang-ulang, karena tidak menempel secara spesifik, sehingga tidak menghasilkan pita tunggal (Holec et al., 2009).

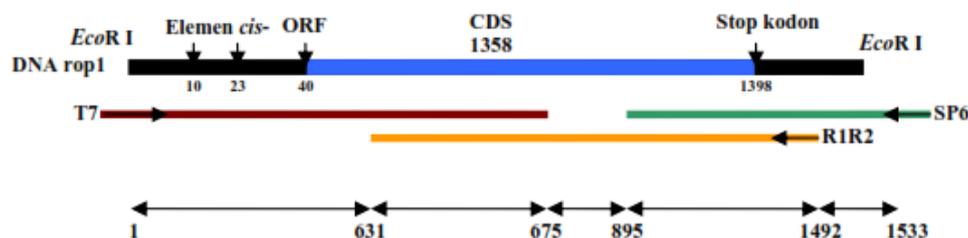
Pengecekan *insert* gen *rop-1* untuk mengetahui posisi DNA *insert* di dalam pET-32a(+) tidak terbalik sehingga dapat diekspresikan oleh *E. coli* sesuai arah transkripsi, dilakukan amplifikasi dengan primer *foward* T7 promoter yang dimiliki oleh pET-32a(+) dan primer *reverse* R1R2. Produk PCR yang dihasilkan diharapkan berupa pita tunggal, berdasarkan perhitungan basa nukleotida *insert* gen *rop-1* hasil sekuensing disertai penambahan basa nukleotida yang menyusun pET-32a(+) antara T7 promoter sampai dengan *EcoR* I yaitu sekitar ± 592 bp, berat molekul DNA diperhitungkan berukuran ± 2105 bp. Produk PCR setelah dianalisis pada gel elektroforesis, menunjukkan ukuran ± 1591 bp sesuai dengan DNA *marker*. Pergeseran ukuran DNA molekul dapat disebabkan oleh beberapa faktor. Kemungkinan pertama kesalahan dalam penggabungan hasil sekuensing basa nukleotida gen *rop-1* dari ketiga primer, sehingga terjadi penambahan basa nukleotida yang mempengaruhi perhitungan berat molekul DNA, tidak sesuai dengan berat molekul basa nukleotida yang sebenarnya teramplifikasi. Kemungkinan lainnya disebabkan penyimpangan mobilitas DNA yang dipengaruhi konsentrasi dan tipe gel agarose yang digunakan (Sambrook and Russel, 2006) atau hasil ini menunjukkan bahwa posisi *insert* gen *rop-1* pada pET-32a(+) tidak terbalik, sesuai dengan arah Bergeraknya transkripsi RNA polimerase T7 pET-32a(+) yaitu berlawanan dengan arah jarum jam dan hasil ini menunjukkan gen *rop-1* berhasil disubklon ke pET-32a(+).

Posisi *insert* yang terbalik apabila diamplifikasi tidak akan menghasilkan produk PCR berupa pita tunggal atau akan muncul pita yang berulang-ulang dan tidak spesifik, karena primer menempel searah.

Analisis Sekuensing Gen *rop-1*

Analisa terhadap hasil sekuensing gen *rop-1*, bertujuan untuk mengetahui kelengkapan faktor-faktor penunjang transkripsi dan translasi seperti promoter pra-inisiasi transkrip gen (TATA box/SP1/GC box) yang terletak pada daerah *upstream* sebelum situs awal transkripsi atau pada *T. gondii* terdapat pengulangan *heptanucleotide* sekuen element inti (A/T GAGACG) pada daerah *upstream*, sebagai tempat perlekatan faktor transkripsi (protein TATA-box *binding*) dan merangsang RNA polimerase untuk berlekatan dengan situs promoter. Keberadaan promoter sangat penting dalam memberikan sinyal-sinyal spesifik sehingga *enhancer* (misal: *Gal4*) yang terikat pada activator transkrip dengan bantuan koaktivator dapat berinteraksi dengan faktor transkripsi. Interaksi antara situs *enhancer* dengan situs inisiator diperlukan dalam ekspresi gen, sehingga protein ROP-1 dapat diekspresikan. *Coding strand* (CDS) adalah urutan basa yang akan diekspresikan menjadi protein, termasuk didalamnya *open reading frame* (ORF) awal transkripsi serta stop kodon (Wilusz et al., 2008). Pada gen *rop-1 T. gondii*, transkripsi yang menyandi protein ROP-1 dimulai dari *second start codon* di posisi 201 bp dan tidak pada posisi 117 bp, karena adanya basa purin (A) pada posisi -3 *second start codon* (ATG) mencegah ribosom membaca sepintas kilas basa nukleotida (melompat), sehingga ribosom dapat menempel dan memulai mentranskrip sekuen basa yang menyandi methionin (Wong, 2008).

Plasmid pWTA-R1 disekensing menggunakan primer promoter SP6, T7 dan primer *reverse* R1R2. Primer *forward* T7 promoter dan primer *reverse* promoter SP6 tersedia dalam konstruksi pGEM®-T Easy, sedangkan primer R1R2 adalah primer *reverse* untuk PCR genom *T. gondii*. Sekuensing gen *rop-1* memiliki *coding strand* (CDS) yang utuh (mulai basa ke-40 sampai 1398). Sekuensing dengan primer T7 promoter didapatkan sekuen *open reading frame* (ATG) (basa ke-40), sudah merupakan *second start codon* gen *rop-1*. Sekuen primer R1F1 (basa ke-10 sampai 30) (primer *forward* untuk PCR gen *rop-1 T. gondii*) dan sekuen gen elemen *cis*-spesifik gen (GC box) (basa ke-10 dan 23). Sekuensing dengan primer SP6 dan R1R2 didapatkan sekuen stop kodon (basa ke-1398) dan sekuen primer R1R2 pada hasil sekuensing dengan SP6 (basa ke-1473 sampai 1492) (Surudarma, 2006). Ilustrasi sekuen elemen *cis*- (GC box), *open reading frame* (ORF) (ATG) dan stop kodon (TAA) ditunjukkan pada Gambar 5.



Gambar 5. Ilustrasi sekuensing DNA ROP-1 beserta komponen-komponen pendukung regulasi ekspresi gen *T. gondii*. Keterangan: DNA ROP-1 hasil amplifikasi primer R1F1 dan R1R2 berukuran ± 1533 bp (Surudarma, 2006) (hitam); *coding* DNA strand ROP-1 (biru); hasil sekuen dengan primer T7 promoter (merah); hasil sekuen dengan primer R1R2 (oranye); hasil sekuen dengan primer SP6 (hijau).

Toxoplasma gondii merupakan parasit eukariot uniseluler dan memiliki mekanisme transkripsi yang unik. Gen yang mengkode protein pada *T. gondii* berupa gen dengan gen salinan tunggal (*single copy*), struktur gennya tidak lazim, karena sebagian besar gen dari DNA genom, cDNA dan mRNA, mempunyai urutan basa yang sama. Tidak seperti parasit protozoa lainnya (*Trypanosoma spp.* dan *Leishmania spp.*), organisasi transkripsi polisistronik dan penyuntingan RNA belum dilakukan pembelajaran lebih lanjut (Xiang *et al.*, 2009). Promotor elemen *cis*- (GC box) pada *T. gondii*, berperan sebagai tempat melekatnya protein TBP (TATA-box binding protein) bersama-sama dengan TFIID dan Sp1 yang menentukan pra-inisiasi transkripsi, karena pada gen *T. gondii* tidak ada TATA box (Wu *et al.*, 2009). Fungsi kotak GC tidak tergantung pada orientasinya sehingga meskipun urutannya dibalik masih dapat berfungsi untuk menstimulasi transkripsi, tetapi letaknya tidak dapat diubah (Yuwono, 2008). Meskipun *T. gondii* memiliki elemen inti transkripsi gen kelas II sama seperti yang ditemukan pada jasad eukariotik lainnya (Wu *et al.*, 2009), pada penelitian ini tidak memakai promotor dari gen *rop-1*, peranan *cis*-elemen sebagai promotor diganti dengan T7 promotor pET-32a(+). T7 promotor merupakan promotor yang dimiliki oleh bakteriophage, dan biasa dikonstruksi pada vektor ekspresi. Promotor ini hanya mengenali RNA polimerase T7 bukan RNA polimerase *E. coli* (Wong *et al.*, 2008).

Hasil sekuensing gen *rop-1 T. gondii* isolat WTA pada pWTA-R1 (kode: M71274.1 dan AF350261.1 *GenBank*) menunjukkan homologi sebesar 99% dan 98% terhadap sekuen gen penyandi ROP-1 *T. gondii* isolat RH dan sekuen partial gen penyandi ROP-1 isolat RH. Hal ini menunjukkan terdapat beberapa basa nukleotida yang berbeda pada gen *rop-1* isolat WTA, tetapi belum tentu mempengaruhi perbedaan asam amino karena bisa saja terjadi *silent* mutasi

(Wilusz, 2008). Kemudian dilakukan pembacaan urutan pengkode asam amino protein ROP-1 berdasarkan sekuensing gen *rop-1*, dimulai dari *open reading frame* yang mengkode 452 aa dengan program *open reading frame finder* (ORF Finder) dan dilakukan analisis sekuens asam amino dengan program *blastx* dan *blastp* (kode: AAV80418.1 *GenBank*), menunjukkan homologi 99% dan 85% terhadap asam amino partial protein ROP-1 *T. gondii* isolat KI-1, pada analisis sekuens asam amino protein ROP-1 *T. gondii* isolat WTA ditemukan satu asam amino yang berbeda yaitu glisin menjadi alanin dan ± 65 asam amino yang tidak ditemukan pada asam amino protein ROP-1 *T. gondii* isolat KI-1. Perbedaan satu asam amino dapat disebabkan triplet basa nukleotida pengkode asam amino berbeda sedangkan tidak ditemukannya asam amino yang sama dapat disebabkan adanya mutasi berupa *adhesi*/penyisipan sekuens nukleotida yang homolog di dua tempat gen *rop-1* isolat WTA saat amplifikasi atau kesalahan penggabungan sekuens dari amplifikasi tiga primer, sehingga terjadi kelebihan basa nukleotida. Sekuens asam amino berdasarkan sekuensing gen *rop-1 T. gondii* isolat WTA setelah dikalkulasi menggunakan program *BLAST Faste* diperoleh berat molekul 48,84 kDa menunjukkan selisih berat molekul kalkulasi ROP-1 isolat RH yaitu 2,84 kDa terhadap berat molekul isolat RH 46 kDa (sekuensing asam amino lengkap dengan *ORF*), dan tidak ditemukan intron (Wilusz, 2008). Identifikasi berat molekul protein ROP-1 adalah 66 kDa (Xiang *et al.*, 2009), tetapi ada pula yang menyebut 60 kDa (Dubey, 2010). Identifikasi berat molekul yang bervariasi ini kemungkinan disebabkan karena proses sintesis protein ROP-1. Protein ROP-1 disintesis sebagai pre-pro-protein, kemudian diproses menjadi pre-protein dalam perjalanan menuju ke *secretory pathway* dan terakhir diproses menjadi protein ROP-1 (*matur*) pada saluran *secretory pathway* (Dubey, 2010). Persamaan homologi yang hampir sama antara *T. gondii* isolat WTA dengan *T. gondii* isolat Korea dan RH dapat memberikan kontribusi bahwa apabila protein ROP-1 *T. gondii* isolat WTA berhasil diekspresikan, diharapkan mampu menekan biaya diagnosis penyakit toksoplasma secara lokal.

Vektor pET-32a(+) yang digunakan pada penelitian ini selain menggunakan T7 promoter yang daya transkripsinya kuat, di dalam konstruksinya mengandung Trx•Tag (N-terminal thioredoxin), yang akan meningkatkan kelarutan protein ROP-1, kemampuan konformasi (*folding*), memperkuat ikatan disulfida dan aktifitas protein ROP-1. Protein His•Tag pada vektor pET-32a(+) memudahkan purifikasi protein ROP-1 menggunakan kromatografi afinitas, His•Tag juga terikat pada protein target (ROP-1) sehingga dapat digunakan untuk identifikasi Western-blot dengan anti-His•Tag, selain anti-ROP-1. Protein S•Tag pada vektor pET-32a(+) untuk mengetahui nilai kuantitas produksi protein yang dihasilkan menggunakan alat FRETworksTMS•TagTM (Wu *et al.*, 2009; pET System Manual 11th Edition, Novagen).

Pada penelitian ini sepenuhnya transkripsi dikontrol oleh T7 promoter yang hanya akan memulai transkripsi setelah diinisiasi oleh RNA polimerase T7. T7 promoter biasa digunakan pada vektor ekspresi karena memiliki daya transkripsi yang tinggi. T7 promoter mampu mengendalikan ekspresi gen sehingga dapat menekan pengaruh toksik protein yang diekspresikan terhadap kelangsungan hidup *E. coli*. Hal ini juga dimaksudkan karena pada organism eukariotik dan prokariotik terkadang kerja promoter tidak begitu maksimal, oleh karena jarak antara sekuens promoter berada jauh dari sekuens DNA yang akan disandi. Maka dari itu diperlukan promoter yang lebih kuat untuk dapat mentranskripsi mRNA dalam konsentrasi tinggi (Sambrook and Russell, 2006). Rekombinan protein yang diekspresikan pada prokariotik akan membentuk badan inklusi (*inclusion body*) di bagian sitosol bakteri *E. coli*, dan sangat berpengaruh terhadap ikatan disulfida sistein pada pembentukan protein (Dubey, 2010). Hal ini tidak menimbulkan masalah pada ekspresi protein ROP-1, karena hasil sekuens asam amino protein

ROP-1 tidak ditemukan sistein, semua gen *rop-1* diekspresikan pada *E. coli* dalam bentuk protein *full-length* dan tanpa sekuen penyandi peptida signal.

Analisis Ekspresi Protein ROP-1

Subkloning gen penyandi protein ROP-1 diperoleh dengan memotong gen *rop-1* pada pWTA-R1. Kloning sebelumnya menggunakan vektor pGEM®-T Easy yang merupakan plasmid *overhangs* T-3` (atau disebut juga metode TA-kloning). Plasmid pGEM®-T Easy adalah plasmid berbentuk linier, dimana DNA *cloned insert* menempel pada satu basa T (timin). Hal ini dimaksudkan karena DNA *cloned insert* berupa produk PCR yang mendapatkan tambahan satu basa A (adenin) pada tiap ujung 3`, sehingga mempermudah ligasi DNA *insert* ke dalam vektor. Basa T (timin) pada vektor akan menempel berpasangan dengan basa A (adenin) pada DNA *insert*.

Gen *rop-1* yang diperoleh dengan memotong *insert* pada sisi restriksi *EcoR* I pada vektor pGEM®-T Easy ternyata memunculkan masalah dalam pembacaan tiga-tiga nukleotida penyandi asam amino protein ROP-1. Berdasarkan urutan nukleotida *insert* gen *rop-1* hasil sekuensing penelitian sebelumnya, diketahui pemotongan *insert* menggunakan enzim *EcoR* I berada jauh diluar *insert* gen *rop-1* dan setelah diligasi ke dalam vektor pET-32a(+) terjadi *frame shift* atau pergeseran kerangka-baca. *Frame shift* terjadi karena vektor pET-32a(+) merupakan vektor ekspresi dilengkapi dengan protein fusi berupa Trx•Tag, His•Tag dan S•Tag. Gen penyandi Trx•Tag, His•Tag dan S•Tag terletak dibagian depan sebelum daerah *multiple site cloning* dimana gen penyandi protein ROP-1 diligasi dan diekspresikan. Kodon start (ATG) dimulai dari urutan basa ke-687 atau 89, yang menyandi protein Trx•Tag, olehkarena kodon start (ATG) dimulai dari gen yang menyandi protein Trx•Tag, maka setelah dihitung tiga-tiga nukleotida yang mengkode polipeptida pada posisi pembacaan +2 *frame* ke-89, terjadi dua *premature stop codon* (PSC) (TGA) sebelum masuk ke *insert* gen *rop-1* (Gambar 18 dan Lampiran 3). *Coding DNA strand* (CDS) gen *rop-1* kaya akan basa GC, sehingga *frame shift* menyebabkan terbentuknya banyak stop kodon TGA (Liang *et al.*, 2010).

Proses transkripsi *coding DNA strand* (CDS) gen *rop-1* oleh RNA polimerase T7 setelah diinduksi IPTG tidak mengalami masalah dalam mencetak mRNA (*messenger RNA*) ROP-1, sebelum proses transkripsi terhenti pada terminator pET-32a(+) yang memberi sinyal pada enzim RNA polimerase T7 untuk menghentikan proses transkripsi (Nishi *et al.*, 2008). Permasalahannya terletak pada proses translasi mRNA protein ROP-1, Wong *et al.*, (2008), menjelaskan bahwa terminasi translasi protein dengan stop kodon TGA pada bakteri mekanismenya tidak begitu jelas. Karena proses terminasi stop kodon TGA tidak hanya dipengaruhi oleh konsentrasi pelepasan protein (*release factor 2*) RF2 yang mengenali UAG tetapi juga posisi sekuens ribosom nukleotida sebelum dan sesudah UAG pada mRNA. Proses translasi gen *rop-1* menggunakan ribosom yang dimiliki oleh pET-32a(+), karena sekuen Shine-Dalgarno (SD) tempat perlekatan ribosom yang berfungsi menterjemahkan kode-kode genetic mRNA menjadi asam-asam amino protein ROP-1 terletak di depan sekuen AUG Trx•Tag yang dimiliki sistem translasi pET. Pembacaan tiga-tiga nukleotida oleh ribosom dimulai dari start kodon Trx•Tag, proses translasi mRNA ROP-1 menjadi rangkaian asam amino protein ROP-1 tidak terjadi karena ribosom terlepas saat mencapai stop kodon (TGA), hanya protein fusi saja yang diekspresikan, kemungkinan memiliki berat molekul sekitar ± 18,2 kDa karena yang ditranslasi ± 510 bp (170 aa) dimulai dari ATG sampai TGA. Pada beberapa organisme, TGA dikenal sebagai pengkode asam amino selenocysteine, meskipun *E. coli* BL21(D3) mengenal sintesis TGA sebagai selenocysteine maka ketika diekspresikan selenocystein akan membentuk ikatan disulfida yang dapat mengubah bentuk epitop protein rekombinan (Liang *et al.*, 2010). Perubahan lainnya berupa protein rekombinan yang diproduksi memiliki urutan asam amino yang berbeda dengan asam amino protein ROP-1.

Messenger RNA ROP-1 dapat ditranslasi apabila terdapat sekuens SD (AGGAGG) sebelum kodon inisiasi AUG ROP-1. Berat molekul protein ROP-1 adalah 66 kDa, karena translasi mRNA hasil transkripsi *coding DNA strand* (CDS) yang terdiri dari dua bagian yaitu sekuens penyandi *signal peptida* dan sekuens penyandi *peptida matur*. Bakteri *E. coli* BL21(DE3) mengekspresikan protein rekombinan ROP-1 dalam bentuk pro-ROP-1 yang belum melewati proses maturisasi atau pemisahan/pergeseran antara ikatan-ikatan *signal peptida* dan *peptida matur*, apabila tidak terjadi pergeseran kerangka baca Protein ROP-1 yang diekspresikan memiliki berat molekul \pm 87 kDa karena bergabungnya protein fusi His•Tag (\pm 6-10 asam amino), Trx•Tag (\pm 109 asam amino) dan S•Tag (\pm 15 asam amino), berat molekul bertambah sekitar 21 kDa (Wu *et al.*, 2009).



Gambar 6. Analisis pembacaan tiga-tiga nukleotida yang mengkode protein ROP-1. **A.** Sisi pemotongan *insert* gen *rop-1* pada pWTA-R1 (pGEM®-T Easy/R1). **B.** Posisi *insert* gen *rop-1* pada pET-32a(+)/R1.

Mutasi pergeseran kerangka-baca pada metode subkloning di atas dapat diatasi dengan mengganti pET-32a(+) dengan pET32b(+) atau dengan membuat primer baru untuk mengamplifikasi gen *rop-1* pada pWTA-R1 dan DNA takizoit. Vektor pET-32b(+) perbedaannya dengan pET-32a(+) yaitu pengurangan satu basa nukleotida, sehingga ketika gen *rop-1* diligasi dan dilakukan pembacaan tiga-tiga nukleotida yang merangkai asam amino protein ROP-1 dimulai dari ATG Trx•Tag atau dari ligasi *EcoR I* +2, tidak terjadi pergeseran pembacaan start kodon ATG gen *rop-1*. Pemilihan pembuatan primer baru dipilih untuk mengatasi masalah *frameshift* karena terbatasnya waktu dan biaya. Primer tersebut disisipkan urutan sekuens enzim endonuklease restriksi *EcoR I* pada ujung 5' dan *Hind III* pada ujung 3'.

Kedua ujung tersebut setelah diligasikan ke vektor ekspresi dan dilihat pembacaan tiga-tiga basa nukleotida yang mengkode asam amino dimulai dari kodon start (ATG), milik Trx•Tag tidak terjadi pergeseran kerangka-baca sampai mencapai kodon stop (TAA), milik gen penyandi protein ROP-1, seperti yang diilustrasikan pada Gambar 6.

Amplifikasi plasmid rekombinan dan DNA genomik *T. gondii* menggunakan primer yang disisipkan basa enzim restriksi untuk subkloning dan ekspresi protein rekombinan telah banyak dilakukan. Khosroshahi *et al.*, dan Olivas *et al.*, (2008), telah mengamplifikasi antigen imunodominan *T. gondii*, ROP-2, SAG-1 dan GRA-7. Gen diamplifikasi dari plasmid rekombinan hasil kloning sebelumnya kemudian diligasi ke vektor ekspresi dan diekspresikan pada *E. coli*.

Proses amplifikasi pWTA-R1 dalam penelitian ini dikontrol dengan memakai kontrol positif dan negatif. Kontrol positif mengandung template DNA takzoit isolat WTA, apabila alat dan bahan dalam keadaan baik, maka terjadi amplifikasi. Kontrol negatif dibuat tanpa menggunakan template, untuk mengetahui ada tidaknya kontaminasi. Kontaminasi terjadi bila, kontrol negative juga terjadi amplifikasi. Analisis elektroforesis amplifikasi pWTA-R1 dan DNA takzoit isolat WTA pada agarose 1% menunjukkan pita tunggal dengan ukuran ± 1512 bp.

4. Simpulan

Penelitian ini berhasil memperoleh plasmid rekombinan pET-32a(+)/R1 secara lengkap dari start kodon hingga stop kodon, namun tidak dapat menghasilkan protein rekombinan Rophtry 1, karena terjadi penambahan satu basa poli T (timin) yang menyebabkan pergeseran pembacaan kerangka baca kodon yang menyandi mRNA (*frame shift*). Permasalahan ini dapat diselesaikan dengan mengurangi atau menambah satu basa dengan menggunakan vektor plasmid ekspresi pET-32b(+) atau pET-32c(+).

Pustaka Acuan

- Dubey, J. P. 2010. *Toxoplasmosis of Animal and Human*. CRC Press Taylor & Francis Group. New York.
- Esposito, D., L. A. Garvey and C. S. Chakiath. 2009. Gateway Cloning for Expression. In: *High Throughput Protein and Purification*. Humana Press, a part of Springer Science+Business Media, LLC. USA.
- Holec-Gasior, L., J. Kur dan E. Hyszczynska-Sawicka. 2009. GRA2 and ROP1 Recombinant Antigens as Potential Markers for Detection of *Toxoplasma gondii*-Specific Immunoglobulin G in Human with Acute Toxoplasmosis. *Clin. Vaccine Immunol.* 6 (4): 510-514.
- Chamber, S. P. And S. E. Swalley. 2009. Designing Experiment for High-Throughput Protein expression. In: *High Throughput Protein and Purification*. Humana Press, a part of Springer Science+Business Media, LLC. USA.
- Khosroshahi, K. H., F. Ghaffarifar, Z. Sharifi and A. Dalimi. 2008. Expression of Complete *Rophtry* Protein 2 (ROP2) Gene of *Toxoplasma gondii* in Eukaryotic Cell. *African J. Biotech.* 7 (24): 4432-4436.
- Liang, H., L. F. Landweber and J. R. Fresco. 2010. Are Stop Codons Recognize by Base Triplets in The Large Ribosomal RNA Subunit. <http://rnajournal.cshlp.org>. 11: 1478-1484.
- Nishi, M., K. Hu, M. M. John and S. R. David. 2008. Organellar Dynamics during the Cell Cycle of *Toxoplasma gondii*. *J. Cell Scien.* 121: 1559-1568.
- Novagen. 2003. pET System Manual. 10th edition. www.novagen.com, diakses 27 Juni 2008.
- Nurjayadi M., F. Kurniadewi, D. Nurkhasanah, W. Sofihan. 2016. Isolation, amplification and characterization of foodborne pathogen disease bacteria gene for rapid kit test development. <https://www.researchgate.net/publication/318343235>. Diakses 6 Oktober 2018.
- Olivas, W. M. 2008. Identification of Changes in Gene Expression by Quantitation of mRNA Levels. In: *Methods in Molecular Biology*, Vol. 419: Post-Transcriptional Gene Regulation. Humana Press. Totowa, NJ.
- Sambrook, J. and D. W Russel. 2006. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 3rd edition. Cold Spring Harbour Laboratory Press. New York.
- Souii, A., J. Gharbi, And M. B. M'hadheb-Gharbi. 2013. *Gene Cloning: A Frequently Used Technology In A Molecular Biology Laboratory - Alternative Approaches*,

- Advantages And Limitations. American Journal Of Research Communication. http://www.usa-journals.com/wp-content/uploads/2013/04/Souii_Vol15.pdf. Diakses 6 Oktober 2018.
- Surudarma, I. W. 2006. Kloning Gen Penyandi Protein *Rophtry* (ROP1) Takizoit *Toxoplasma gondii* Isolat Lokal. Program Pascasarjana Bioteknologi UGM. Yogyakarta.
- Wilusz, J. W. 2008. Post-Transcriptional Gene Regulation. Humana press. Totowa, USA.
- Wong, T., S Fernandes, N. Sankhon, P. P. Leong, J. Kuo and J Liu. 2008. Role of Premature Stop Codons in Bacterial Evolution. J. of Bact.
- Xiang, Z., Y. QuiLin, L. HuiMin. 2009. Expression of ROP1 Gene of *Toxoplasma gondii* RH Strain in *Lactococcus lactis*. J. Clin. Microbiol. <http://www.pubmed.com>.
- Yuwono, T. 2008. Biologi Molecular. Jakarta: Airlangga.