

Kloning dan ekspresi cDNA penyandi protein solubel 28 kDa (GRA2) takizoit *Toxoplasma gondii* isolat lokal

Jarot Subandono¹, Wayan T. Artama², Supargiyono³

¹Fakultas Kedokteran, Universitas Sebelas Maret, Surakarta

²Program Studi Bioteknologi, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta

³Program Studi Ilmu Kedokteran Tropis, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta

ABSTRACT

Jarot Subandono, Wayan T. Artama, Supargiyono - *Cloning and expression of cDNA encoding 28 kDa soluble protein (GRA2) tachyzoite of Toxoplasma gondii local isolate*

Background: *Toxoplasma gondii* is an intracellular parasite that causes toxoplasmosis and found in tropical countries. Toxoplasmosis is dangerous if suffered by pregnant woman or immunodeficiency patients. *T. gondii* has 28 kDa soluble protein from dense granule (GRA2) and among GRA proteins, GRA2 is probably the most immunogenic. Disruption of the GRA2 locus in *T. gondii* has resulted in decreasing of the parasite virulence in mice. Invasion of tachyzoite *T. gondii* into macrophages was also significantly inhibited by anti GRA2 antibody, therefore the availability of GRA2 protein is essential for development of protective vaccine.

Objective: The aim of this research was to produce 28 kDa soluble protein (GRA2) by cloning and expression of cDNA encoding soluble protein tachyzoite of *T. gondii* local isolate.

Methods: Total ribonucleic acid (RNA) and messenger RNA was isolated from tachyzoite of local *T. gondii* grown up in Balb/c mice. Messenger RNA was isolated from total RNA using polyATtract mRNA Isolation Systems and synthesis of cDNA using Universal RiboClone cDNA Synthesis Systems. Recombinants of pUC18 were transformed into *E. coli* XL1-Blue by *heat shock* technique. Expression of recombinant protein was analysed by immunoblotting using polyclonal antibodies against soluble protein of *T. gondii*.

Results: Two recombinant clones were isolated which expressed 28 kDa recombinant protein.

Conclusion: Two recombinant clones were isolated. The immunoblotting result indicates that the recombinant expressed 28 kDa recombinant protein which hybridized with the antibody polyclonal against soluble protein of *T. gondii* and the proteins are possibly GRA2 proteins.

Key words : *Toxoplasma gondii* - tachyzoite - cDNA - 28 kDa soluble protein.

ABSTRAK

Jarot Subandono, Wayan T. Artama, Supargiyono - *Kloning dan ekspresi cDNA penyandi protein solubel 28 kDa (GRA2) takizoit Toxoplasma gondii isolat lokal*

Latar belakang: *Toxoplasma gondii* merupakan parasit intraselular penyebab toksoplasmosis yang banyak ditemukan di negara tropis. Penyakit ini berbahaya bila diderita oleh wanita hamil atau penderita yang mengalami imunodefisiensi. *T. gondii* memiliki protein solubel 28 kDa dari granula padat (GRA2) yang paling imunogenik dibandingkan dengan protein GRA lainnya. Hilangnya lokus gen yang menyandi protein GRA2 ini akan menurunkan virulensi *T. gondii* pada mencit sehingga dapat mencegah infeksi akut *T. gondii* pada mencit. Antibodi anti GRA2 dapat mencegah invasi *T. gondii* ke dalam sel makrofag, oleh karena itu untuk pengembangan vaksin yang produktif perlu diproduksi protein 28 kDa (GRA2) ini.

Tujuan: Tujuan penelitian ini adalah untuk memproduksi protein solubel 28 kDa (GRA2) takizoit *T. gondii* isolat lokal dengan melakukan kloning dan ekspresi cDNA penyandi protein tersebut.

Bahan dan cara: RNA total diisolasi dari takizoit lokal yang diperbanyak secara *in vivo* pada mencit strain Balb/c. Messenger RNA diisolasi dari RNA total dengan menggunakan *polyAtract mRNA isolation systems* dan sintesis cDNA menggunakan *Universal RiboClone cDNA Synthesis Systems*. Plasmid UC18 yang telah diligasi dengan cDNA ditransformasikan ke *E. coli* XL1-Blue dengan teknik *heat shock*. Koloni rekombinan yang didapatkan ditumbuhkan dalam LB *medium* untuk isolasi pUC18 rekombinan dan ekspresi protein rekombinan. Protein rekombinan yang terekspresi dianalisis dengan imunoblotting menggunakan antibodi poliklonal terhadap protein solubel *T. gondii* isolat lokal.

Hasil: Penelitian ini berhasil mendapatkan dua koloni rekombinan yang membawa cDNA penyandi protein solubel 28 kDa (GRA2) takizoit *T. gondii* isolat lokal

Simpulan: Transformasi pUC18 pada *E. coli* XL1-Blue menunjukkan dua koloni yang membawa cDNA penyandi protein rekombinan takizoit *T. gondii* isolat lokal dan dengan imunoblotting yang menggunakan antibodi poliklonal terhadap protein solubel takizoit *T. gondii* isolat lokal didapatkan protein solubel dengan berat molekul 28 kDa yang diindikasikan sebagai protein GRA2.

(B.I.Ked. Vol. 36, No.2: 67-76, 2004)

PENGANTAR

Toksoplasmosis merupakan penyakit yang disebabkan oleh protozoa *Toxoplasma gondii*. *T. gondii* merupakan parasit yang mempunyai sifat intraselular dan ekstraselular sebagai penyebab toksoplasmosis yang merupakan penyakit parasiter yang tersebar di seluruh dunia dan merupakan salah satu penyakit yang banyak ditemukan di daerah tropis. Penyakit ini berbahaya bila diderita oleh wanita hamil atau penderita yang mengalami imunodefisiensi seperti AIDS. Wanita hamil yang menderita infeksi toksoplasmosis primer dapat mengalami keguguran dan dapat juga terjadi kelainan kongenital yang berat pada janin seperti hidrosefalus, retardasi mental dan retinokoroiditis yang dapat menyebabkan kebutaan^{1,2,3}.

T. gondii memiliki beberapa macam protein, beberapa di antaranya merupakan komponen protein solubel yang dapat bertindak sebagai imunogen dan dapat menginduksi respons imun, karena terdiri dari komponen-komponen yang bersifat imunogenik seperti protein GRA yang berperan memodifikasi membran vakuola parasitoforus dan membran plasma sel hospes sehingga menguntungkan perkembangan parasit⁴. Vakuola parasitoforus yang dibentuk dengan protein GRA ini tahan asam dan dapat mencegah fusi dengan lisosom⁵. *Toxoplasma gondii* yang masuk ke dalam makrofag (difagositosis menggunakan reseptor Fc atau *Fragment of crystallizable* setelah diselubungi antibodi) akan berfusi dengan lisosom sehingga dapat dihancurkan oleh enzim yang terdapat di lisosom. *T. gondii* yang masuk tanpa melalui reseptor Fc akan selamat oleh karena tidak terjadi fusi dengan lisosom dan cara

yang dipakai dengan mensekresi protein GRA untuk memodifikasi vakuola parasitoforus⁶.

Davidson⁷ menyatakan bahwa protein solubel memiliki berat molekul sekitar 14-133 kDa dan di antara protein solubel tersebut memiliki berat molekul 28 kDa. Cha *et al.*⁸ menyatakan bahwa salah satu protein solubel adalah protein 28 kDa yang tidak lain adalah protein GRA2. Cesbron-Delauw⁹ menyatakan bahwa protein 28 kDa adalah protein GRA2 dan di antara protein GRA yang paling imunogenik adalah protein GRA2. Mercier¹⁰ menyatakan bahwa tidak adanya lokus gen yang menyandi protein GRA2 akan menurunkan virulensi *T. gondii* akut pada mencit, sehingga protein ini berperan mencegah infeksi akut *T. gondii*. Protein antigen ini dapat menjadi salah satu kandidat vaksin yang efektif pada penderita imunodefisiensi seperti AIDS dan keganasan. Singh³ menyatakan perlu mencegah infeksi parasit intraselular seperti *T. gondii* ini dengan vaksin efektif dari protein granula padat seperti protein GRA2.

Penelitian tentang protein solubel seperti protein GRA *T. gondii* telah banyak dilaporkan, seperti yang sudah dilakukan oleh Vercamen *et al.*¹¹ dengan *T. gondii* strain RH, diketahui bahwa protein GRA1 yang disekresi oleh takizoit dan bradizoit *T. gondii* dapat memacu respons imun humoral pada mencit dan manusia serta mampu merangsang proliferasi sel T, sedangkan protein GRA7 mampu memacu kadar antibodi yang cukup tinggi, tetapi belum pernah dilaporkan tentang kloning dan ekspresi cDNA penyandi protein solubel 28 kDa (protein GRA2) takizoit *T. gondii* isolat lokal dengan teknik DNA rekombinan.

Penelitian ini bertujuan untuk memproduksi protein solubel 28 kDa (protein GRA2) takizoit *T. gondii* dengan melakukan transformasi pUC 18 pada *E. coli* XL1-Blue untuk melakukan kloning dan ekspresi cDNA penyandi protein solubel 28 kDa (protein GRA2) takizoit *T. gondii* isolat lokal. Protein solubel 28 kDa (protein GRA2) merupakan protein parasit *T. gondii* yang sangat penting untuk dapat diisolasi ataupun diproduksi untuk berbagai keperluan seperti pengembangan perangkat diagnosis, penelitian patogenitas penyakit maupun pengembangan vaksin.

BAHAN DAN CARA

1. Tempat dan Tahun Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Pusat Studi-Bioteknologi Universitas Gadjah Mada Yogyakarta, mulai bulan Agustus 2002 sampai dengan bulan November 2003.

2. Parasit dan Hewan Coba

Protozoa takizoit *T. gondii* isolat lokal diperoleh dari Pusat Studi-Bioteknologi Universitas Gadjah Mada Yogyakarta. *Toxoplasma gondii* isolat lokal berasal dari hasil isolat dari otot diafragma hewan ternak kambing di Bogor.

Mencit Balb/c betina yang berumur 3 bulan dengan berat rata-rata 15 gram sebanyak 5 ekor digunakan untuk memproduksi antibodi poliklonal terhadap protein solubel *T. gondii* dan 50 ekor mencit Balb/c yang berumur 3 bulan dengan berat rata-rata 15 gram untuk kultivasi in vivo takizoit *T. gondii* untuk isolasi RNA.

3. Isolasi RNA *Toxoplasma gondii*

Cara kerja penelitian selanjutnya sama dan tidak ada perubahan.

4. Sintesis cDNA

Hasil purifikasi mRNA ini selanjutnya digunakan untuk sintesis cDNA yang juga melalui beberapa tahap seperti: tahap sintesis cDNA untai tunggal, sintesis cDNA untai ganda, penambahan adaptor *EcoR* I pada cDNA, reaksi fosforilasi dan eliminasi kelebihan adaptor. Penambahan adaptor *EcoR* I

pada cDNA untuk memberikan lengan pada cDNA tersebut sebagai tempat ligasi sehingga didapatkan cDNA dengan *EcoR* I arm. Fosforilasi atau penambahan fosfat diperlukan karena cDNA tidak mengandung fosfat, agar cDNA dapat menempel pada vektor atau plasmid (pUC 18). *Complementary* DNA yang dihasilkan diligasikan dengan pUC 18 yang sudah didigesti dengan *EcoR* I dan hasil ligasi tersebut kemudian akan ditransformasikan ke dalam *E. coli* XL1-Blue.

5. Transformasi pUC 18 pada *E. coli* XL1-Blue

Proses transformasi dalam penelitian ini dikerjakan dengan melakukan transformasi vektor pUC 18 yang telah diligasi dengan cDNA *T. gondii* pada *E. coli* XL1-Blue dengan cara *heat shock* pada suhu 42°C selama 56 detik. Dinding sel *E. coli* XL1-Blue dibuat kompeten, sehingga dinding sel *E. coli* bersifat permeabel dan dapat dilewati molekul DNA plasmid yang kecil. Hasil transformasi kemudian ditanam pada *plate* agar (media agar semi *solid*) yang telah diberi Ampisilin, IPTG dan X-Gal selama semalam pada suhu 37°C¹².

6. Isolasi Plasmid Rekombinan (pUC 18 Rekombinan)

Isolasi plasmid rekombinan (pUC 18 rekombinan) bertujuan untuk membuktikan bahwa koloni berwarna putih yang diharapkan membawa *insert* cDNA penyandi protein rekombinan *T. gondii*, memiliki pita yang lebih tinggi dibandingkan koloni berwarna biru yang tidak membawa *insert* cDNA penyandi protein rekombinan *T. gondii*.

Koloni tunggal *E. coli* XL1-Blue yang membawa pUC18 rekombinan (koloni putih) dan kontrol koloni biru, masing-masing ditumbuhkan pada 6 ml LB *medium* yang telah diberi Ampisilin dan diinkubasikan pada suhu 37°C semalam dengan agitasi 200 rpm dan dilanjutkan dengan isolasi plasmid metode *boiling* kemudian dielektroforesis pada gel agarosa 1%.

7. Isolasi Protein Solubel *Toxoplasma gondii*

Protein solubel tersebut didapatkan dari takizoit *Toxoplasma gondii* isolat lokal hasil kultur pada

mencit Balb/c. Hasil isolasi takizoit ini dibersihkan dengan *normal saline* dan *tris-amonium chloride* untuk melisiskan eritrosit. Pelet takizoit yang sudah bersih dari eritrosit (jumlah minimal harus mencapai 1×10^9 sel/ml) dipecah dengan dilewatkan jarum 27 gauge dan disaring dengan *polycarbonate membrane* ukuran 3 mm (Nucleopore, USA). Resuspensi pelet setelah pencucian terakhir dengan 3ml *normal saline* yang berisi 10 mg/ml TLCK dan 1mM PMSF kemudian disonikasi dengan sonikator (B. Braun) untuk memecah membran takizoit. Hasil sonikasi disentrifugasi dan supernatan yang didapatkan sebagai protein solubel.

8. Ekspresi Protein Rekombinan

Koloni rekombinan (*E. coli* rekombinan) yang diduga membawa *insert* cDNA (pUC 18 rekombinan) yang menyandi protein rekombinan *T. gondii* ditumbuhkan pada *LB medium* yang telah diberi IPTG sebagai *inducer*. Masing-masing koloni ditumbuhkan semalam pada suhu 37°C dengan agitasi 200 rpm. Biakan *E. coli* rekombinan yang masing-masing berjumlah 30 ml disentrifugasi dengan kecepatan 3000 rpm 4°C selama 20 menit dan pelet yang didapatkan dipecah dengan sonikator (B. Braun), lalu disentrifugasi dan supernatan yang diperoleh mengandung protein rekombinan yang dicari.

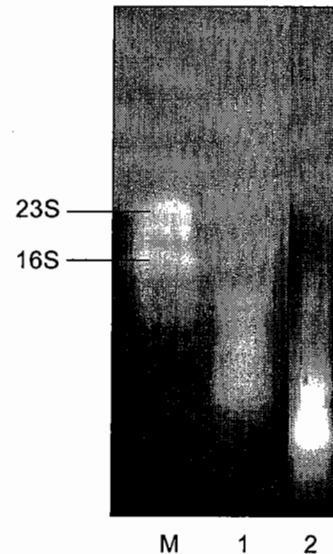
9. Immunoblotting

Protein rekombinan yang dicari yang sudah ditransfer ke membran nitroselulosa selanjutnya *blocking*. *Blocking* pada prosedur immunoblotting di atas memakai BSA 1% semalam dengan tujuan mengemblok supaya protein tidak menempel di tempat lain sehingga dapat meningkatkan spesifisitas. Selanjutnya dilakukan immunoblotting dengan menggunakan antibodi poliklonal terhadap protein solubel takizoit *T. gondii* yang diperoleh dari serum mencit Balb/c dilanjutkan sampai dengan penambahan BCIP dan NBT di kamar gelap sampai pita protein tampak. Di lain pihak, untuk protein *E. coli* XL1-Blue dan marker tidak dilakukan transfer ke membran nitroselulosa tetapi diwarnai dengan pewarnaan *amidoblack*.

HASIL

1. RNA *Toxoplasma gondii*

Pada penelitian ini 1×10^{10} takizoit *T. gondii* yang diperoleh dari hasil kultivasi *in vivo* dipergunakan untuk isolasi RNA. Hasil elektroforesis RNA yang diisolasi dari takizoit *T. gondii* pada gel agarosa 1% dapat dilihat pada GAMBAR 1.

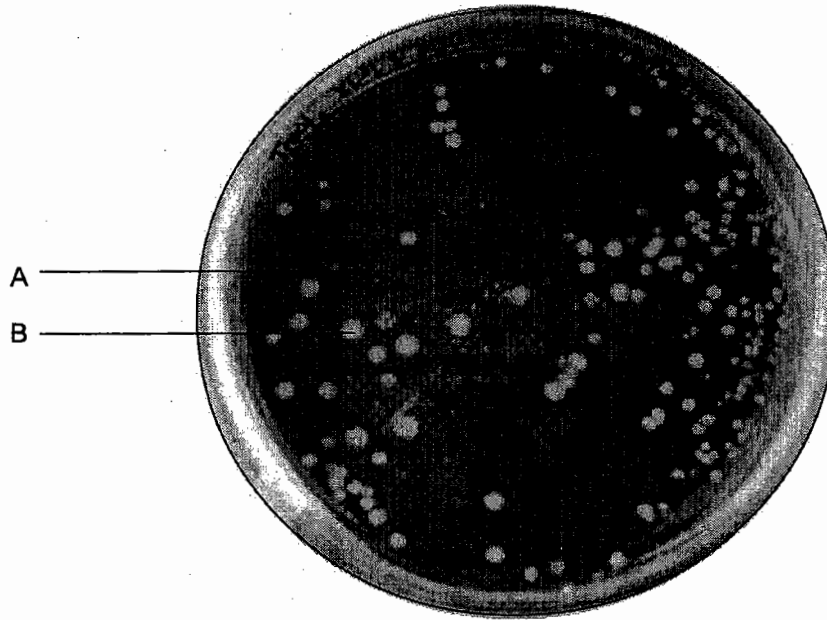


GAMBAR 1. Hasil elektroforesis RNA yang diisolasi dari *T. gondii* stadium takizoit pada gel agarosa 1%. M: Marker 23S rRNA dan 16S rRNA, 1: RNA total, 2: RNA total - mRNA

GAMBAR 1 menunjukkan bahwa pita rRNA cukup jelas, sedangkan mRNA menunjukkan *smear* di antara pita-pita rRNA. Jumlah mRNA yang terdapat pada *T. gondii* lebih sedikit dibandingkan rRNA sehingga sulit untuk mendapatkan pita yang jelas seperti pada rRNA.

2. Transformasi pUC 18 pada *Escherichia coli* XL1-Blue

Transformasi pUC 18 pada *E. coli* XL1-Blue dilakukan karena plasmid memerlukan sel hospes untuk melakukan replikasi. Plasmid dapat melakukan replikasi sendiri secara bebas, tetapi hanya mampu bereplikasi apabila terdapat dalam sel hospes seperti sel *E. coli* XL1-Blue. Hasil transformasi pUC 18 pada *E. coli* XL1-Blue dapat dilihat pada GAMBAR 2.



GAMBAR 2. Hasil transformasi pUC 18 pada *E. coli* XL1-Blue pada media agar semi *solid* yang telah diberi Ampisilin, IPTG dan X-Gal.

A: Koloni berwarna biru dan B: Koloni berwarna putih.

Koloni putih pada GAMBAR 2 sekitar 60 koloni, sedangkan koloni biru berjumlah sekitar 12 koloni. Koloni biru menunjukkan bahwa plasmid tersebut tidak membawa *insert* cDNA, sedangkan koloni putih kemungkinan membawa *insert* cDNA yang diharapkan menyandi protein rekombinan yang dicari.

3. Isolasi Plasmid Rekombinan (pUC 18 Rekombinan)

Isolasi plasmid rekombinan (pUC 18 rekombinan) bertujuan untuk membuktikan bahwa koloni berwarna putih yang diharapkan membawa *insert* cDNA penyandi protein rekombinan *T. gondii* memiliki pita yang lebih tinggi dibandingkan koloni berwarna biru yang tidak membawa *insert* cDNA penyandi protein rekombinan *T. gondii*. Hasil isolasi plasmid rekombinan yang dielektroforesis pada gel agarosa 1% dapat dilihat pada GAMBAR 3.

Hasil transformasi menunjukkan 4 plasmid rekombinan dari sekitar 60 koloni putih yang memiliki pita lebih tinggi dibanding pUC 18 kontrol.

4. Protein Solubel Takizoit *T. gondii*

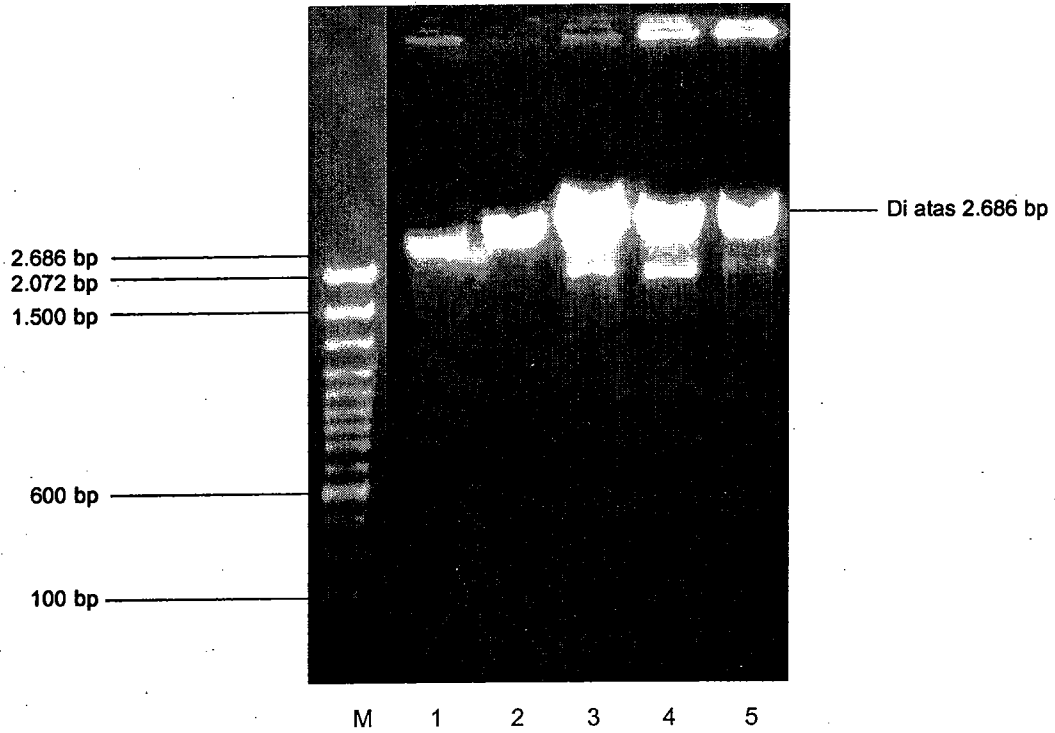
Protein solubel takizoit *T. gondii* diperlukan sebagai antigen untuk memacu terbentuknya antibodi poliklonal pada mencit Balb/c betina. Hasil elektroforesis protein solubel takizoit *T. gondii* pada SDS PAGE 10% dengan pewarnaan *silver stain* dapat dilihat pada GAMBAR 4.

GAMBAR 4 memperlihatkan beberapa pita protein solubel di antaranya pita protein solubel yang beratnya 28 kDa.

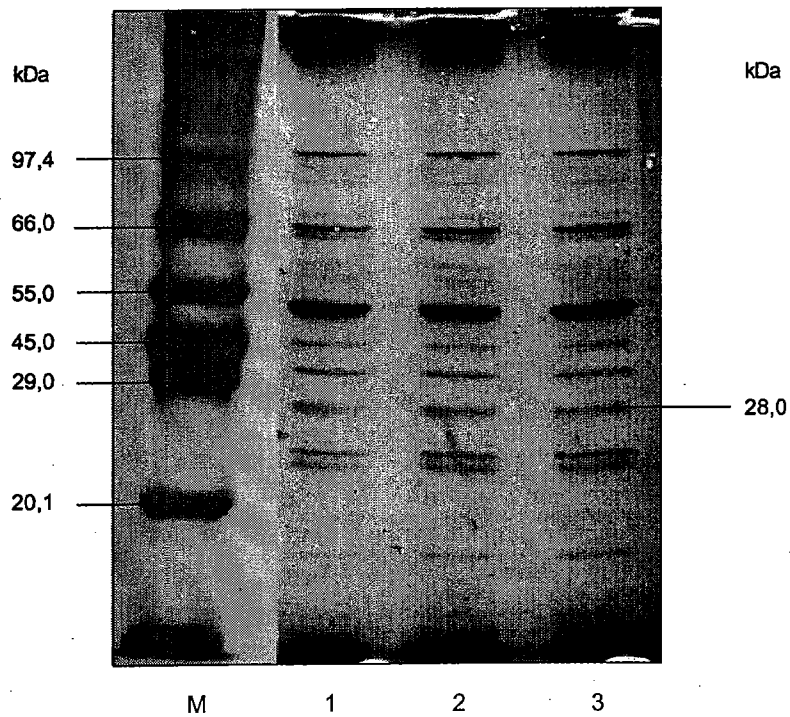
5. Immunoblotting

Protein rekombinan dari masing-masing koloni selanjutnya dielektroforesis pada SDS PAGE 10% dan dilanjutkan prosedur immunoblotting dengan menggunakan antibodi poliklonal terhadap protein solubel takizoit *T. gondii*. Hasil immunoblotting pada 4 koloni rekombinan menunjukkan profil protein seperti pada GAMBAR 5.

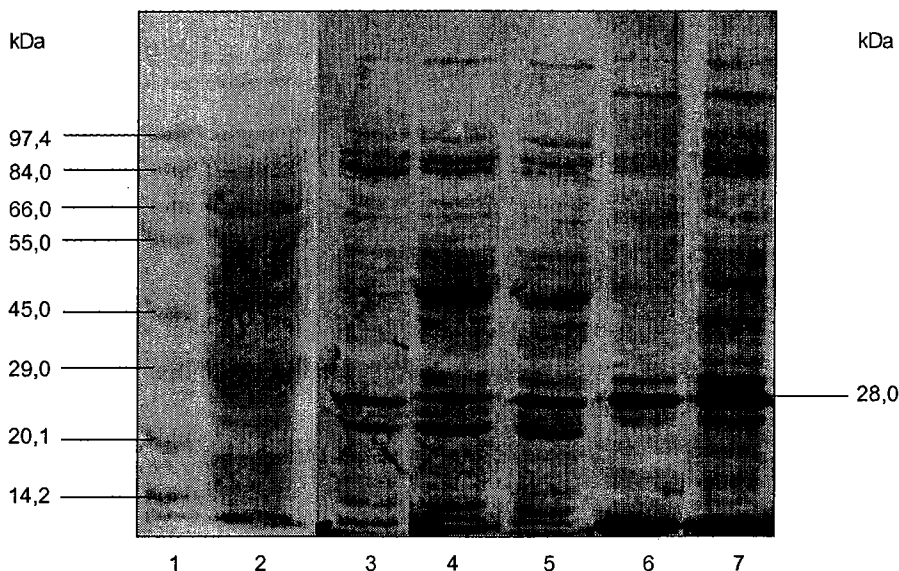
Hasil immunoblotting pada 4 klon rekombinan menunjukkan protein rekombinan yang dominan yaitu protein yang memiliki berat molekul 28 kDa



GAMBAR 3. Hasil elektroforesis plasmid rekombinan (pUC 18 rekombinan)
M: DNA marker, 1. pUC 18; 2-5. pUC 18 rekombinan, 2 dan 4: Plasmid UC 18 rekombinan yang diharapkan membawa *insert* cDNA penyandi protein solubel 28 kDa.



GAMBAR 4. Hasil elektroforesis protein solubel takizoit *Toxoplasma gondii* dengan pewarnaan *silver stain*.
M: Marker protein standar, 1, 2 dan 3: Protein solubel



GAMBAR 5. Hasil elektroforesis protein dari biakan *E.coli* rekombinan pembawa gen penyandi protein rekombinan *T. gondii* yang diimunoblotting dengan antibodi poliklonal terhadap protein solubel takizoit *T. gondii*. 1: Protein standar, 2: Lisat protein dari *E.coli* dengan pewarnaan *amidoblack*, 4, 5, 6 dan 7: Hasil imunoblotting protein dari koloni rekombinan, 3: Protein koloni berwarna biru (bukan rekombinan). Kolom 6 dan kolom 7, keduanya dari koloni yang berbeda tetapi menyandi protein solubel 28 kDa yang sama.

PEMBAHASAN

Penelitian ini dimulai dengan menumbuhkan takizoit *T. gondii* pada mencit Balb/c dan dilanjutkan melakukan isolasi RNA. Jumlah mRNA yang terdapat pada *T. gondii* lebih sedikit dibandingkan rRNA sehingga sulit untuk mendapatkan pita yang jelas seperti pada rRNA. Penelitian ini memperlihatkan bahwa RNA total yang diisolasi relatif tidak terdegradasi dan di dalam RNA total tersebut terdapat mRNA yang akan dipakai untuk sintesis cDNA. Messenger RNA dalam penelitian ini tidak dielektroforesis karena jumlahnya sedikit yaitu 14 mg, sebagai suatu perbandingan pada *E. coli* didapatkan sebanyak 5% dari RNA total adalah mRNA sedang rRNA dan tRNA masing-masing adalah 80% dan 15%¹³. Messenger RNA mempunyai ukuran yang berbeda-beda sesuai dengan besaran gen yang menyandi sehingga pada Gambaran elektroforesis terlihat pita-pita tipis yang kelihatan tersebar sehingga membentuk *smear* dan dari sekian banyak mRNA hanya sebagian yang menyandi protein solubel takizoit *T. gondii*, sedangkan rRNA menunjukkan pita yang jelas. Hasil purifikasi mRNA ini selanjutnya digunakan

untuk sintesis cDNA yang juga melalui beberapa tahap. Konsentrasi DNA diukur dengan spektrofotometer *DU-65 spectrophotometer* (Beckman) pada OD₂₆₀ didapatkan konsentrasi DNA untaiganda = 95 mg/ml DNA dan kemurnian DNA = 1,267.

Complementary DNA yang dihasilkan diligasasi dengan pUC 18 yang sudah didigesti dengan *EcoR* I dan hasil ligasi tersebut kemudian ditransformasikan ke dalam *E. coli* XL1-Blue dengan cara *heat shock*. *Escherichia coli* XL1-Blue yang membawa pUC18 rekombinan akan membentuk koloni berwarna putih sedangkan *E. coli* XL1-Blue yang tidak membawa pUC18 rekombinan akan berwarna biru. Koloni putih yang didapatkan sekitar 60 koloni, sedangkan koloni biru berjumlah sekitar 12 koloni. Koloni biru menunjukkan bahwa plasmid tersebut tidak membawa *insert cDNA*, sedangkan koloni putih kemungkinan membawa *insert cDNA* yang diharapkan dan untuk memastikan bahwa koloni putih tersebut membawa *insert cDNA* yang diharapkan maka koloni putih tersebut ditumbuhkan pada LB medium yang telah diberi Ampicillin dan selanjutnya dilakukan isolasi plasmid dengan metode boiling.

Hasil isolasi plasmid yang dielektroforesis pada gel agarosa 1% menunjukkan 4 plasmid rekombinan/pUC 18 rekombinan (dari sekitar 60 koloni putih) yang memiliki pita lebih tinggi dibanding pita plasmid bukan rekombinan (pUC18). Hasil elektroforesis plasmid tersebut menunjukkan pUC18 (yang tidak membawa *insert* cDNA) besarnya adalah 2.686 bp, sedangkan pUC18 rekombinan yang diduga membawa *insert* cDNA penyandi protein rekombinan yang dicari (protein solubel 28 kDa) di atas 2.686 bp. Plasmid rekombinan (pUC18 rekombinan) menunjukkan pola pita plasmid yang bervariasi tingginya dan menunjukkan pita plasmid rekombinan yang lebih tinggi dibanding kontrol pUC18. Pita plasmid rekombinan yang lebih tinggi tersebut menunjukkan adanya *insert* cDNA pada plasmid rekombinan sehingga mempunyai berat molekul yang lebih besar dibanding plasmid kontrol pUC 18 (tidak membawa *insert* cDNA). Plasmid rekombinan yang lebih besar tersebut pada waktu dielektroforesis akan migrasi lebih lambat karena ukurannya lebih besar sehingga memberi gambaran pita plasmid yang lebih tinggi.

Hasil elektroforesis protein solubel takizoit *T. gondii* pada SDS PAGE 10% dengan pewarnaan *silver stain* memperlihatkan beberapa pita protein solubel di antaranya pita protein solubel yang beratnya 28 kDa yang akan dipakai pada imunobloting untuk mengenali protein rekombinan yang dicari.

Koloni putih yang diduga membawa *insert* cDNA ditumbuhkan dalam LB *medium* yang diberi IPTG sebagai *inducer* untuk ekspresi protein rekombinan yang diharapkan (protein solubel 28 kDa). Hasil elektroforesis dalam SDS-PAGE 10% menunjukkan pita-pita dengan berat molekul yang bervariasi dari 14 kDa sampai 97 kDa. Protein koloni rekombinan menunjukkan pola pita yang berbeda dengan protein koloni bukan rekombinan. Pola pita protein yang berbeda-beda tersebut menunjukkan bahwa koloni rekombinan tersebut memiliki protein yang berbeda-beda. Perbedaan protein tersebut dipengaruhi oleh adanya *insert* cDNA yang akan berpengaruh terhadap transkripsi dan translasi sehingga protein yang diekspresikan akan berbeda. Pita protein rekombinan tersebut di antaranya memiliki berat molekul sekitar 28 kDa yang akan dianalisis lebih lanjut dengan imunobloting.

Hasil imunobloting pada 4 klon rekombinan menunjukkan profil protein yang berbeda dengan protein dari klon bukan rekombinan. Protein 28 kDa yang ditunjukkan oleh pita lebih tebal dengan gambaran pita yang berbeda dengan koloni biru dan intensitas pembentukan pita protein rekombinan tersebut menunjukkan intensitas yang lebih kuat dan berbeda dibanding protein kontrol, ini berarti protein tersebut adalah protein rekombinan karena antibodi yang dipakai adalah antibodi poliklonal terhadap protein solubel *T. gondii*. Antibodi poliklonal tersebut mengenal protein rekombinan tersebut karena berasal dari protein solubel *T. gondii*. Protein yang berat molekulnya sama atau tinggi pitanya sama belum tentu protein tersebut sama. Protein 28 kDa dikenal oleh antibodi poliklonal terhadap protein solubel *T. gondii*, maka dapat dipastikan bahwa protein rekombinan tersebut adalah protein solubel dengan berat molekul 28 kDa yang merupakan protein hasil ekspresi cDNA takizoit *T. gondii* isolat lokal.

Sibley *et al*⁶ melakukan penelitian sejenis untuk mendeteksi salah satu protein solubel *T. gondii* strain RH yaitu protein GRA2 memakai antibodi poliklonal yang diperoleh dari kelinci. Elektroforesisnya dilakukan pada SDS PAGE 10%, teknik blotingnya juga menggunakan teknik *semidry blotting*, tetapi *blockingnya* tidak memakai BSA 1% melainkan memakai *non-fat dry milk* 1%. Hasil penelitiannya menunjukkan bahwa protein GRA2 secara khusus ditargetkan menuju jaringan tubulovesikuler yang membentuk saluran dengan membran vakuola sehingga menguntungkan perkembangan parasit di dalam sel hospes.

Antibodi hanya mengikat bagian tertentu dari makromolekul seperti protein dan bagian tersebut disebut dengan epitop. Epitop atau determinan antigenik adalah bagian antigen yang dapat merangsang respons imun (menginduksi pembentukan antibodi) dan dapat diikat dengan spesifik oleh bagian antibodi^{14,15}. Epitop yang tersusun dari segmen tunggal polipeptida dan berupa rantai lurus disebut dengan *continous* atau *linear epitope* dan biasanya terdiri dari sekitar 6 asam amino¹⁴. Epitop yang terbentuk karena pelipatan (*folding*) protein disebut dengan *conformational* atau *discontinous epitope*^{14,15}.

Cesbron-Delauw *et al.*⁹ menyatakan bahwa di antara protein GRA yang paling imunogenik

adalah protein GRA2. Mercier¹⁰ menyatakan bahwa tidak adanya lokus gen yang menyandi protein GRA2 akan menurunkan virulensi akut pada mencit, sehingga protein ini berperan mencegah infeksi akut *T. gondii*. Cha *et al.*⁸ menyatakan invasi takizoit *T. gondii* ke dalam makrofag dapat dihambat dengan pemberian anti GRA2. Dimier-Poisson *et al.*¹⁶ menyatakan bahwa rancangan strategi vaksin ke depan untuk mencegah invasi *T. gondii* dapat dilakukan dengan pendekatan imunologi mukosa melalui saluran pencernaan dan Bivas-Benita *et al.*¹⁷ menyatakan penggunaan vaksin peroral dengan protein GRA yang dikemas dengan mikropartikel tertentu dapat meningkatkan respons imun terhadap *T. gondii*, oleh karena itu Singh³ menyatakan perlu mencegah infeksi parasit intraselular seperti *T. gondii* ini dengan vaksin efektif dari protein granula padat seperti protein GRA2.

SIMPULAN

Simpulan yang dapat ditarik dari penelitian ini adalah bahwa transformasi pUC18 pada *E. coli* XL1-Blue menghasilkan dua koloni yang membawa cDNA penyandi protein rekombinan takizoit *T. gondii* isolat lokal dan dengan prosedur immunoblotting yang menggunakan antibodi poliklonal terhadap protein solubel takizoit *T. gondii* didapatkan protein solubel dengan berat molekul 28 kDa yang diindikasikan sebagai protein GRA2.

SARAN

Protein rekombinan yang berhasil diisolasi adalah protein solubel dengan berat molekul 28 kDa, yang diindikasikan sebagai protein GRA2, perlu dibuktikan dengan melakukan sekuensing dan DNA alignment serta skrining dengan menggunakan antibodi monoklonal terhadap protein GRA2 takizoit *T. gondii*.

UCAPAN TERIMA KASIH

Kami sangat menyadari bahwa kami banyak memperoleh bantuan dari berbagai pihak, yang telah membantu baik selama penelitian sampai dengan penulisan laporan penelitian ini, oleh karena itu

dengan segala kerendahan hati kami mengucapkan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada: Prof. Dr. H. Soeyoko DTM&H, SU, sebagai Pengelola Program Studi Kedokteran Tropis UGM, Prof. dr. Marsetyawan HNES, MSc., PhD., drh. Widya Asmara, SU, PhD., Kepala Pusat Studi Bioteknologi UGM beserta staf, yang telah memberikan izin untuk menggunakan fasilitas dan tempat penelitian dan Kepala Laboratorium Biokimia, Pusat Studi Bioteknologi UGM beserta teknisi-teknisinya yang telah banyak membantu pelaksanaan penelitian di laboratorium.

KEPUSTAKAAN

1. Dubey JP. Toxoplasmosis, microbiology and microbial infection, New York: Oxford University Press, 1998.
2. Bahia-Oliveira LMG, Jones JL, Azevedo-Silva J, Alves CCF, Orefice F, Addiss G. Highly endemic, waterborne toxoplasmosis in North Rio de Janeiro State, Brazil, Emerging Infectious Disease, Vol. 9, No. 1, CDC, January 2003, Brazil, 2003.
3. Singh S. Mother-to-child transmission and diagnosis of *Toxoplasma Gondii* infection during pregnancy. Indian J Med Microbiol, 2003; 21(2).
4. Susanto L, Gandahusada S dan Muljono R. Invasi *Toxoplasma gondii* ke dalam sel hospes serta diferensiasinya dari takizoit ke bradizoit. MKI, 1999; 49: 208-211.
5. Bonhomme. Quantitative immunolocalization of a P29 protein (GRA7), a new antigen of *Toxoplasma gondii*. J Histochem & Cytochem, 1998; 46: 1411-22.
6. Sibley LD and Andrews NW. Cell invasion by unpalatable parasites. New York: Munksgaard, 2000.
7. Davidson MM. New techniques, human toxoplasmosis. Oxford: Oxford University Press, 1992.
8. Cha DY, Song IK, Lee GS, Hwang OS, Noh HJ, Yeo SD, et al. Effects of specific monoclonal antibodies to dense granular proteins on the invasion of *Toxoplasma gondii* in vitro and in vivo, Korean J Parasitol, 2001; 39(3): 233-40.
9. Cesbron-Delauw MF, Lecordier L. and Mercier C. Role of secretory dense granule organelles in the pathogenesis of toxoplasmosis. In: Gross U. editor. *Toxoplasma gondii*, pp. 59-64. Berlin: Springer-Verlag, 1996.
10. Mercier. Targeted disruption of the GRA2 locus in *Toxoplasma gondii* decreases acute virulence in mice. Infect Immun, 1998; 66(9): 4176-82.
11. Vercammen M, Scorza T, Huygen K, De Braekeleer J, Diet R, Jacobs D et al. DNA Vaccination with genes encoding *Toxoplasma gondii* antigens GRA1, GRA7 and ROP2 induces partially protective immunity against lethal challenge in mice, Infect Immun, 2000; 68: 38-45.
12. Sambrook, Fritsch J and Maniatis EF. Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd. ed. New York: Coldspring Harbor Laboratory Press, 1989.

13. Stryer L. Biokimia, vol.1 edisi 4, cetakan 1, Alih bahasa Prijanti AR et al. Jakarta: EGC, 2000.
14. Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS. Cellular and molecular immunology, 4th ed. Philadelphia: W.B. Saunders Company, 2000.
15. Janeway CA, Travers P, Walport M, Shlomchik M. Immunobiology, evolution of the immune system: past, present, and future. New York: Garland Publishing, 2001.
16. Dimier-Poisson I, Aline F, Mévélec M, Beauvillain C, Buzoni-Gatel D and Daniel Bout. Protective mucosal Th2 immune response against *Toxoplasma gondii* by murine mesenteric lymph node dendritic cells. Infect Immun, 2003; 71(9): 5254–65.
17. Bivas-Benita M, Laloup M, Versteyhe S, Dewit J, De Braekeleer J, Kongert E, Borchard G. Generation of *Toxoplasma gondii* GRA1 protein and DNA vaccine loaded chitosan particles: preparation, characterization, and preliminary in vivo studies. Int J Pharm, 2003; 266(1-2): 17-27.