

**ISOLASI DAN IDENTIFIKASI EKSPRESI PROTEIN REKOMBINAN *GRANULE-1 (GRA-1)*  
*Toxoplasma gondii* ISOLAT LOKAL**

**ISOLATION AND IDENTIFICATION EXPRESSION OF *GRANULE-1 (GRA-1)* RECOMBINANT  
PROTEIN *Toxoplasma gondii* LOCAL ISOLATE**

**Hevi Wihadmadyatami<sup>1</sup>, Rini Widayanti<sup>2</sup>, Wayan Tunas Artama<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Bagian Anatomi, Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta

<sup>2</sup>Bagian Biokimia, Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta

E-mail: heviwihadmadyatami@ugm.ac.id

**ABSTRACT**

Toxoplasmosis is a disease caused by intracellular protozoa called *Toxoplasma gondii*. Many efforts have been done to overcome this disease, but unfortunately it has not showed many satisfactory results. *GRA-1* is an antigen produced by tachyzoite and bradyzoite of *Toxoplasma gondii*. This protein can be used as diagnostic tools and vaccine candidate, because *GRA-1* has capability to induce humoral and cellular immune response in both human and mice. The cloning of *GRA-1* gene in expression vector of pET-32a(+) has been successfully done. The aim of this research is to isolate and identify expression of *GRA-1* recombinant protein. The protein have been successfully got using recombinant technique. *Escherichia coli* bacteria BL21 that was already transformed with pET-32a(+) recombinant grown in LB medium containing ampicillin and IPTG. By using a standard procedure, recombinant protein was isolated from bacteria using affinity chromatography of nickel-TED. The result of purification recombinant protein will be electroforized again and identified by using immunoblotting. The results of this research show that gene encoding of *GRA-1* protein has been successfully expressed. *GRA-1* protein has been successfully isolated and purified with molecular weight 24 kDa. Identification using immunoblotting shows that there is antigen antibody reaction between polyclonal antibody anti ESA or anti *GRA-1* and *GRA-1* recombinant protein.

**Key words:** *T. gondii*, *GRA-1* recombinant protein, SDS-PAGE, immunoblotting

**ABSTRAK**

Toksoplasmosis merupakan penyakit karena infeksi protozoa intraseluler *Toxoplasma gondii*. Usaha untuk mengendalikan penyakit ini telah banyak dilakukan namun belum menunjukkan hasil yang memuaskan. Antigen *GRA-1* merupakan protein yang diproduksi oleh takizoit dan bradizoit *Toxoplasma gondii* dan dapat digunakan sebagai perangkat diagnostik dan kandidat vaksin. Protein ini dapat diisolasi dari parasit tetapi untuk mendapatkan kuantitas yang mencukupi masih menghadapi kendala. Kloning gen *GRA-1* pada vector ekspresi pET-32a (+) telah berhasil dilakukan. Tujuan penelitian ini adalah untuk melakukan isolasi dan identifikasi ekspresi protein rekombinan *GRA-1* pada *T. gondii*. Gen penyandi *GRA-1* diekspresikan pada bakteri *E. coli* BL21 yang telah disisipi gen *GRA-1* menggunakan plasmid pET-32a(+) ke dalam media LB yang mengandung ampisilin dan IPTG. Protein kemudian diisolasi, diidentifikasi dengan SDS-PAGE dan dilanjutkan dengan purifikasi protein dengan prinsip afinitas kromatografi. Hasil purifikasi protein rekombinan dielektroforesis kembali dan diidentifikasi dengan immunoblotting. Hasil penelitian menunjukkan bahwa protein *GRA-1* telah berhasil diisolasi dan diidentifikasi dengan berat molekul 24 kDa. Identifikasi dengan immunoblotting menunjukkan adanya reaksi antigen antibodi antara antibodi poliklonal anti ESA dan antibodi poliklonal anti *GRA-1* dengan protein rekombinan *GRA-1*.

**Kata kunci:** *T. gondii*, protein rekombinan *GRA-1*, SDS-PAGE, immunoblotting

## PENDAHULUAN

Toksoplasmosis adalah penyakit karena infeksi protozoa intraseluler *Toxoplasma gondii*. Penyakit ini dapat menyerang baik pada manusia maupun hewan dan bersifat zoonosis yaitu dapat ditularkan dari hewan ke manusia (Bivas-Benita, 2003; Chandra, 2005). Toksoplasmosis merupakan penyakit dengan tingkat kejadian yang tinggi baik pada manusia ataupun hewan (Chandra, 2005; Faria dkk, 2007; Fusco dkk, 2007; Iskandar, 2005). Infeksi *T. gondii* umumnya tidak menunjukkan gejala klinis sehingga diagnosis penyakit ini sering terabaikan, namun karena toksoplasmosis menimbulkan dampak yang sangat merugikan maka banyak dilakukan usaha pencegahan dan pengobatan terhadap penyakit ini. Salah satu upaya tersebut adalah dengan menggunakan vaksin, namun sampai saat ini belum tersedia vaksin spesifik untuk *T. gondii*. Tindakan pengobatan terhadap infeksi *T. gondii* juga tidak memuaskan karena tidak ada satupun obat yang sanggup untuk mengeradikasi *T. gondii* dalam bentuk sista. Pemberian *sulfonamide* dan *pyremethamine* dapat membunuh *T. gondii* pada stadium takizoit, tetapi pengobatan tersebut tidak efektif pada stadium bradizoit (Black and Boothroyd, 2000). Pemberian *pyremethamine* pada usia kehamilan 16 minggu sangat berbahaya karena *pyremethamine* memiliki sifat teratogenik (Golkar dkk, 2004; Radke dkk, 2007).

Saat ini terdapat berbagai macam metode diagnosis toksoplasmosis akan tetapi belum memberikan hasil yang memuaskan. Kit deteksi toksoplasmosis konvensional sebagian besar menggunakan antigen yang diperoleh dari menumbuhkan takizoit dalam hewan coba (tikus)

atau dengan menggunakan kultur jaringan, dimana memungkinkan kontaminasi dengan material di luar parasit sehingga sensitivitas dan spesivitas kit menjadi menurun (Velmurugan dkk, 2008). *Toxoplasma gondii* memiliki antigen yang beragam, namun yang berkaitan langsung dengan imunopatogenesis dan invasi ke dalam sel adalah antigen yang berasal dari protein permukaan (*surface antigen*) dan *excretory-secretory antigen* (ESA). Protein granula padat (GRA) adalah komponen utama ESA yang disekresikan berlebihan (Cha dkk, 2001). Vaksinasi dengan protein *GRA-1* mampu menginduksi respon imun protektif terhadap infeksi *T. gondii* pada beberapa hewan uji. Vaksinasi *GRA-1* dapat membangkitkan respon imun humoral dan seluler baik sistemik maupun lokal (Bivas-Benita dkk, 2003).

Kajian pemanfaatan rekombinan protein *T. gondii* sebagai perangkat diagnostik toksoplasmosis sangat penting untuk dilakukan. Penelitian tentang protein *GRA-1 T. gondii* isolat RH sudah banyak dilaporkan, tetapi kloning dan ekspresi cDNA gen penyandi protein *GRA-1* takizoit *T. gondii* isolat lokal belum banyak diketahui. Widayanti (2008) telah berhasil melakukan kloning gen *GRA-1* takizoit *T. gondii* isolat lokal, selanjutnya perlu dilakukan isolasi, identifikasi dan purifikasi protein rekombinan *GRA-1*.

## MATERI DAN METODE

Biakan bakteri *E. coli* BL 21 sebanyak 25 ml yang membawa plasmid rekombinan (pET-32a(+)-*GRA-1*) ditempatkan pada tabung konikel kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 3000 rpm pada suhu 4°C selama 10 menit. Supernatan dibuang dan

pelet dicuci dengan PBS I. Sentrifugasi dengan kecepatan 3000 rpm pada suhu 4°C selama 10 menit dan pencucian pelet dengan PBS I dilakukan sebanyak tiga kali. Pelet dilarutkan dengan 1 ml PBS I dan dipecah dengan sonikasi selama 30 detik sebanyak lima kali dengan interval waktu 30 detik. Pelet yang telah disonikasi disentrifugasi dengan kecepatan 12.000 rpm selama 5 menit dan supernatan diambil, selanjutnya diidentifikasi dengan SDS-PAGE. Proses elektroforesis diawali dengan menuangkan gel poliakrilamid 12% pada plat dan diratakan permukaannya dengan butanol, setelah gel berpolimerisasi, butanol dibuang dan gel dicuci dengan *aquadest*. *Stacking gel* 3% dituang di atas gel, selanjutnya sisir dipasang untuk membuat sumuran, setelah *stacking gel* berpolimerisasi, plat dirangkai dengan *aparatus elektroforesis*. Bufer elektroda dituang ke dalam tangki dan sisir diangkat, ditambahkan sampel buffer (4 : 1) direbus dalam air mendidih selama 2 menit. Sampel dimasukkan ke dalam sumuran *stacking gel*. *Aparatus elektroforesis* dihubungkan dengan *power supply* (100 volt selama 2 jam) untuk dielektroforesis. Setelah sampel mencapai *front*, gel diambil dan diwarnai dengan *commasie brilliant blue* selama semalam. Gel yang telah diwarnai dibersihkan dengan larutan *destaining* hingga transparan dan disimpan dalam asam asetat 10%. Setelah dilakukan identifikasi dilanjutkan dengan purifikasi protein rekombinan.

Purifikasi protein rekombinan ini didasarkan pada prinsip kromatografi afinitas, hasil purifikasi selanjutnya diidentifikasi dengan imunoblotting. Proses imunoblotting dimulai dengan produksi antibodi poliklonal anti ESA dan anti *GRA-1* dimana *Crude protein* takizoit (ESA) *T. gondii* sebanyak 5

$\mu\text{g}/\mu\text{l}$  dilarutkan dalam akuabides steril dan diemulsikan dengan *Freund's complete adjuvant* (perbandingan 1:1) untuk penyuntikan pertama, sedangkan untuk penyuntikan kedua dan seterusnya digunakan *Freund's incomplete adjuvant*. Emulsi disuntikkan pada rongga peritoneum dari mencit Balb/C betina umur 8-10 minggu dengan jarum 25 *gauge*. Penyuntikan diulang 5 kali dengan interval waktu 14 hari. Metode yang sama digunakan untuk produksi antibodi poliklonal anti *GRA-1*, kemudian titer antibodi poliklonal ditentukan dengan menggunakan metode ELISA. Antibodi dengan titer tertinggi yang akan digunakan dalam imunoblotting.

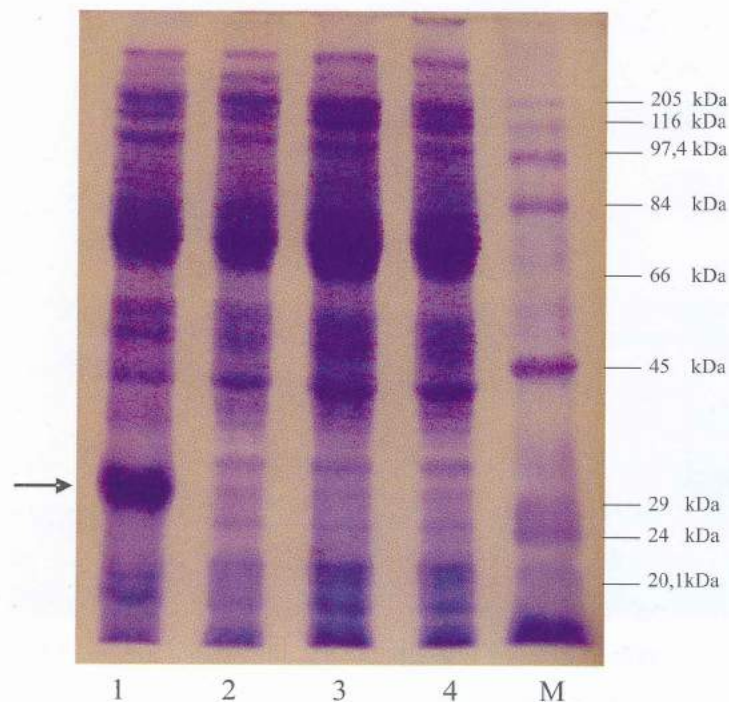
## HASIL DAN PEMBAHASAN

Langkah pertama yang dilakukan untuk mengisolasi protein rekombinan *GRA-1* dengan cara menumbuhkan bakteri *E. coli* BL21 yang telah disisipi gen *GRA-1* pada plasmid pET-32a(+) ke dalam media LB yang mengandung ampisilin. Klon protein rekombinan tersebut ditumbuhkan pada suhu 37°C, selanjutnya dilakukan induksi dengan IPTG (*Isopropyl -1-thio- $\beta$ -D-galactoside*) ketika nilai *optical density* pada panjang gelombang 595 nm sampai mencapai nilai OD 0,600. Bakteri berkembang biak dengan berlipat dua kalinya pada fase ini, jumlah bakteri meningkat secara eksponensial. Fase eksponensial berlangsung selama 18-24 jam, pada pertengahan fase ini pertumbuhan bakteri sangat ideal, pembelahan terjadi secara teratur, semua bahan dalam sel berada dalam keadaan seimbang (*balanced growth*) (Syahrurachman dkk., 1994).

Kloning gen penyandi *GRA-1* menggunakan

plasmid pET-32a(+) sebagai vektor untuk mengekspresikan gen penyandi *GRA-1*. Vektor pET-32a(+) merupakan derivat pBR322 yang memiliki sifat *low copy number*, dan vektor ini lebih menitikberatkan pada overekspresi protein. Pemilihan *E.coli* sebagai inang untuk ekspresi disebabkan karena *E.coli* mengandung gen *chromosomal copy* T7 *Ribo Nucleid Acid* polimerase. *Ribo Nucleic Acid* polimerase *bacteriophage* T7 dapat mentranskripsi plasmid sirkuler beberapa kali (Sambrook dan Russel, 2001; Wong, 2006), sehingga gen *GRA-1* pada *multiple cloning site* dapat diekspresikan secara maksimal. Sistem ekspresi menggunakan promotor T7, gen *GRA-1* yang terletak *downstream* di bawah kendali promotor tidak akan diekspresikan sampai tersedia IPTG. Pemberian IPTG pada media pertumbuhan akan memacu produksi dari T7 RNA polimerase

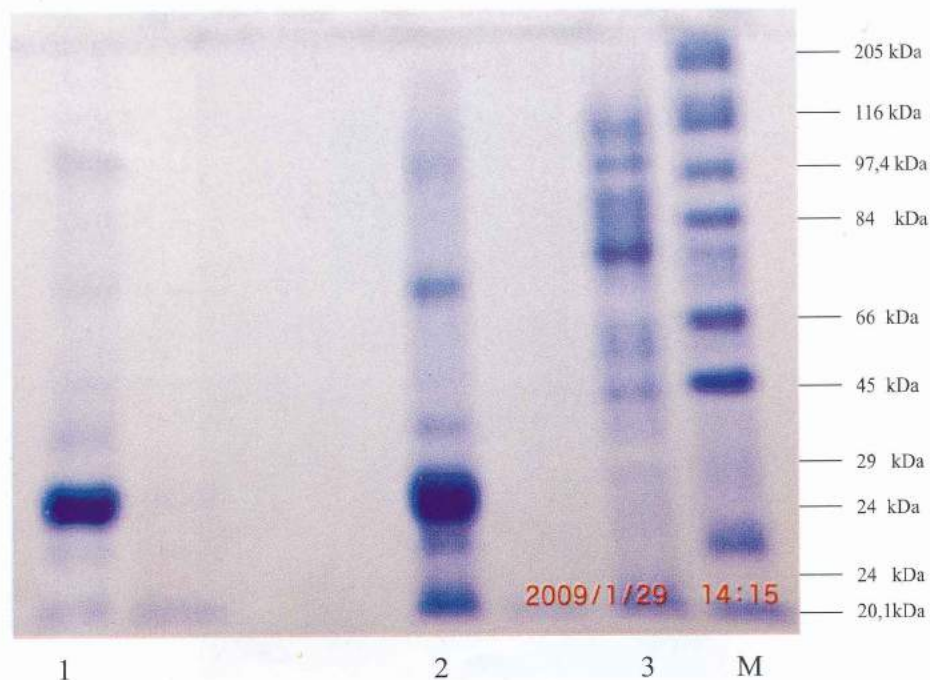
yang berada di bawah kendali promotor *lac*. Transforman akan mengekspresikan gen yang dimilikinya, jika IPTG ditambahkan untuk menginduksi T7 RNA polimerase, kemudian berjalan mengenali promotor T7 pada vektor ekspresi untuk memulai transkripsi (Wong, 2006). Pemberian ampisilin bertujuan sebagai *selective marker* yaitu menyeleksi sel bakteri hasil transformasi. (Sambrook dan Russel, 2001). Proses sonikasi diperlukan untuk memecah dinding sel bakteri transforman sehingga gen penyandi *GRA-1* yang terekspresi dapat diperoleh. Sonikasi dilanjutkan dengan sentrifugasi dengan kecepatan 3000 rpm, protein *GRA-1* terlarut pada supernatan hasil sonikasi dan sentrifugasi. Protein rekombinan *GRA-1* kemudian diidentifikasi dengan SDS-PAGE. Hasil elektroforesis protein rekombinan *GRA-1* dapat dilihat pada Gambar 1.



Gambar 1. Hasil elektroforesis protein rekombinan *GRA-1* dalam supernatan hasil sonikasi pada gel poliakrilamid 12 %. Keterangan: Marker (M), protein rekombinan dari koloni *putih* menunjukkan adanya protein rekombinan *GRA-1* (lajur 1), protein dari koloni *E.coli* BL21 (lajur 2), protein dari koloni *E.coli* BL21 yang membawa pET-32a(+) (lajur 3), protein bukan rekombinan dari koloni biru (lajur 4).

Profil protein pada Gambar 1 menunjukkan pola pita yang berbeda dibandingkan lajur yang lain. Perbedaan tersebut disebabkan adanya gen *insert* pada plasmid *pET-32a(+)* yang mengekspresikan protein rekombinan *GRA-1* sebesar 24 kDa, sehingga mempengaruhi transkripsi dan translasi plasmid yang dibawa sel inang. Pita protein *GRA-1* apabila dibandingkan dengan marker berada pada posisi lebih tinggi dari 24 kDa meskipun telah diketahui bahwa protein *GRA-1* memiliki berat molekul sebesar 24 kDa. Hal tersebut disebabkan adanya fusi protein TrxTag, HisTag, dan STag vektor ekspresi *pET-32a(+)* yang ikut terekspresi. Protein TrxTag berperan dalam pembentukan ikatan disulfida protein *GRA-1* yang mempengaruhi pelipatan protein, sehingga protein yang

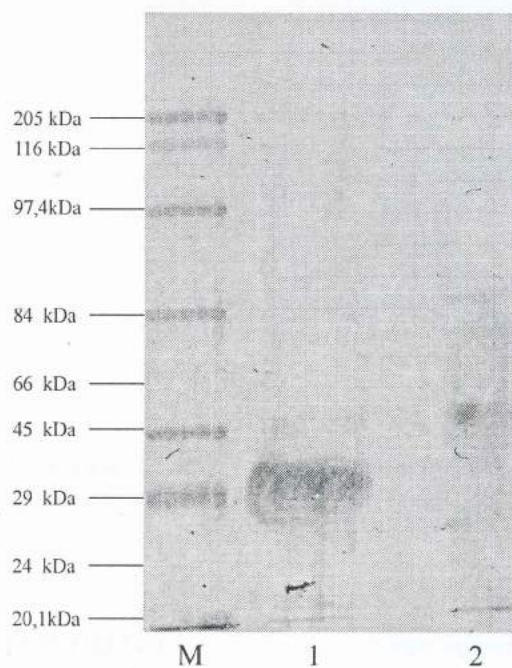
diekspresikan menyerupai konformasi aslinya dan juga protein TrxTag berfungsi meningkatkan kelarutan protein. Keberadaan fusi protein ini dapat mempercepat dan mempermudah proses purifikasi (Velmurugan *et al.*, 2008). Purifikasi pada penelitian ini menggunakan prinsip kromatografi afinitas antara *sequence* HisTag dan ion logam yang telah diimobilisasi ( $Ni^{2+}$ ). Logam ( $Ni^{2+}$ ) terimobilisasi dengan berikatan pada *chelating group* yaitu *tris-carboxymethyl ethylene diamine* (TED) dan *iminodiacetic acid* (IDA). Hasil identifikasi dengan gel poliakrilamid 12% pada Gambar 1 menunjukkan adanya pita tunggal dari protein rekombinan *GRA-1* yang telah dipurifikasi (lajur 1), sedangkan pada lajur 2 dan 3 masih tampak pita protein selain protein target.



Gambar 2. Hasil purifikasi protein rekombinan *GRA-1* diidentifikasi dengan SDS-PAGE 12 %. Keterangan: Marker (M), protein rekombinan yang telah dipurifikasi (lajur 1 dan lajur 2), protein dari koloni *E.coli* BL21 (lajur 3).

Imunoblotting atau *western blotting* adalah suatu teknik identifikasi dimana antibodi digunakan untuk mendeteksi keberadaan antigen pada matriks padat seperti membran nitroselulose. Antibodi mempunyai kemampuan untuk berikatan dengan berbagai macam antigen termasuk makromolekul dan substansi kimia yang sangat kecil (Abbas dan Lichtman, 2009). Bagian dari antigen yang dapat dikenali oleh antibodi dikenal sebagai epitop atau

determinan. Determinan antigen yang berbeda-beda dapat dikenali berdasarkan *sequence* (epitop linier) atau bentuk epitop (konformasi epitop). Kemampuan interaksi untuk terjadinya pengikatan antara antibodi dengan satu epitop antigen disebut dengan afinitas (Abbas dan Lichtman, 2009). Hasil imunoblotting protein rekombinan GRA-1 dengan menggunakan antibodi poliklonal anti ESA dapat dilihat pada Gambar 3.

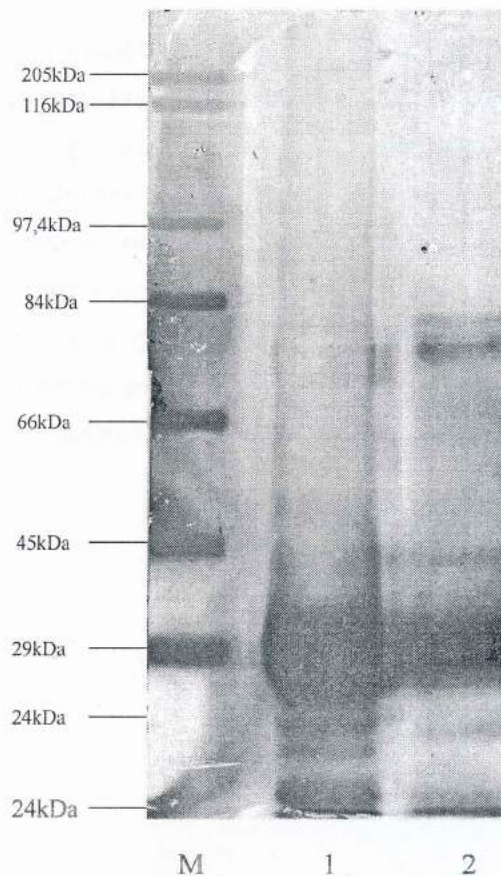


Gambar 3. Hasil elektroforesis SDS-PAGE 12% supernatan produk sonikasi diblotting dengan antibodi poliklonal anti ESA. Keterangan: Marker (M), protein rekombinan dari koloni putih yang telah dipurifikasi (lajur 1), protein rekombinan dari koloni putih tanpa purifikasi (lajur 2).

Protein rekombinan yang dihasilkan setelah direaksikan dengan antibodi poliklonal anti ESA menunjukkan adanya pita yang bereaksi positif dengan antibodi poliklonal yang digunakan, walaupun reaksi yang terlihat tidak tebal (Gambar 3). Imunoblotting menggunakan antibodi poliklonal anti GRA-1 diperlukan untuk meyakinkan ekspresi protein rekombinan GRA-1. Hasil elektroforesis SDS-PAGE 12 % supernatan produk sonikasi

diblotting dengan antibodi poliklonal anti GRA-1 disajikan pada Gambar 4.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa protein GRA-1 telah berhasil diisolasi dan di purifikasi dengan berat molekul 24 kDa. Identifikasi dengan imunoblotting menunjukkan adanya reaksi antigen antibodi antara antibodi poliklonal anti ESA dan antibodi poliklonal anti GRA-1 dengan protein rekombinan GRA-1.



Gambar 4. Hasil elektroforesis SDS-PAGE 12 % supernatan produk sonikasi dibloting dengan antibodi poliklonal anti *GRA-1*. Keterangan: Marker (M), protein rekombinan dari koloni putih yang telah dipurifikasi (lajur 1), protein rekombinan dari koloni putih tanpa purifikasi (lajur 2).

Gambar 4 menunjukkan adanya reaksi yang positif antara protein rekombinan *GRA-1* dengan antibodi poliklonal anti *GRA-1* (Lajur 1 dan Lajur 2), Antibodi poliklonal anti *GRA-1* berikatan dengan protein *GRA-1* pada kertas nitroselulosa melalui pembentukan kompleks antigen-antibodi.

Berdasarkan penelitian dapat disimpulkan bahwa protein rekombinan *GRA-1* telah berhasil diisolasi dan diidentifikasi dengan berat molekul 24 kDa. Protein rekombinan *GRA-1* dapat diidentifikasi menggunakan SDS-PAGE dan imunobloting menggunakan antibodi poliklonal anti *GRA-1* dan anti ESA.

#### UCAPAN TERIMAKASIH

Penulis mengucapkan terimakasih kepada Prof. Dr. drh. Wayan Tunas Artama atas diikutsertakannya penulis dalam Hibah KKP3T tahun 2008 yang didanai oleh Kementerian Pertanian Republik Indonesia.

#### DAFTAR PUSTAKA

Abbas, A. K., Lichtman, A. H. 2009. *Basic Immunology Function and Disorders of The Immune System*. 4th ed. W.B. Saunders Company, Philadelphia.

- Bivas-Benita, M., Laloup, M., Versteyhe, S., Dewit, J., De Braekeleer, J., Jongert, E., Borchard, G. 2003. Generation of *Toxoplasma gondii* GRA1 protein and DNA vaccine loaded chitosan particle: preparation, characterization, and preliminary *in vivos* Studies. *Int. J. Pharm.* 266:17-27.
- Black, M. W., Boothroyd, J. C. 2000. Lytic cycle of *Toxoplasma gondii*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 64(3): 607-623.
- Cha, D. Y., Song, I. K., Lee, G. S., Hwang, O-S., Noh, H-J., Yeo, S-D., Shin, D-W., Lee, Y-H. 2001. Effects of specific monoclonal antibodies to dense granular proteins on the invasion of *Toxoplasma gondii* *in vitro* and *in vivo*. *The Korean J. of Parasitol.* 39(3): 233-240.
- Chandra, G. 2005. *Toxoplasma gondii : Aspek Biologi, Epidemiologi, Diagnosis, dan Penatalaksanaannya*. Aventis Pharma Indonesia.
- Faria, E. B., Gennari, M. S., Pena, H. F. J., Athayde, R. A. C., Silva, M. L. C. R., Azevedo, S. S. 2007. Prevalence Of anti-*Toxoplasma gondii* and anti-*Neospora caninum* antibodies in goats slaughtered in the public slaughterhouse of Patos city, Paraiba State, Northeast region of Brazil. *Veterinary Parasitology.* 149: 126-129.
- Fusco, G., Rinaldi, L., Guarino, A., Proroga, Y. T. R., Pesce, A., Giuseppina, D. M., Cringoli, G. 2007. *Toxoplasma gondii* in sheep from the Campania Region (Italy). *Veterinary Parasitology.* 149: 271-274.
- Golkar, M., Shokrgozar, M. A., Rafati, S., Sadai, M. R., Assmar, M. 2004. Construction, expression and preliminary immunological evaluation of a DNA plasmid encoding the GRA2 protein of *Toxoplasma gondii*. *Iran. Biomedical J.* 9 (1): 1-8.
- Iskandar, T. 2005. *Pencegahan Toksoplasmosis Melalui Pola Makanan dan Cara Hidup Sehat*. Prosiding Lokakarya Nasional Penyakit Zoonosis: 235-241.
- Radke, J. R., Eibs, C. A., Fox, P. D. 2007. Host cell directed interactions with *Toxoplasma* influence pathogenesis the host molecular environment can influence parasite growth and cyst development. *Microbe* 2(5): 244-250.
- Sambrook, J. Russel, D.W. 2001. *Molecular cloning: A laboratory manual*. 3<sup>rd</sup> edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Syarurachman, Agus. 1994. *Buku Ajar Mikrobiologi Kedokteran*. Bina Rupa Aksara. Jakarta.
- Velmurugan, V. G., Tewari, A. K., Rao, J. G., Baidya, S., Kumar, M. U., Mishra, K. A. 2008. High level expression of SAG 1 and GRA 7 gene of *Toxoplasma gondii* (Izatnagar isolate) and their application in serodiagnosis of goat toxoplasmosis. *Veterinary Parasitology.* 154: 185-192.
- Widayanti, E. 2008. *Subkloning dan Over Ekspresi Gen Penyandi Protein GRA-1 Takizoit Toxoplasma gondii Isolat Lokal*. Tesis S-2. Program Studi Bioteknologi, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.
- Wong, D. W. S. 2006. *The ABCs of gene cloning*. 2<sup>nd</sup> edition. Springer Science and Business Media, Inc., New York.