

Kloning dan Analisis Hasil Kloning Gen *GRA1* dari Takizoit *Toxoplasma gondii* Isolat Lokal

DIDIK T. SUBEKTI¹, W.T. ARTAMA², E. SULISTYANINGSIH³, S.H. POERWANTO⁴, Y. SARI⁵ dan F. BAGASKORO⁵

¹Balai Besar Penelitian Veteriner, Bogor

²Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta

³Fakultas Kedokteran Universitas Negri Jember, Jember

⁴Fakultas Biologi Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta

⁵PAU Bioteknologi Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta

(Diterima dewan redaksi 5 Desember 2007)

ABSTRACT

SUBEKTI, D.T., W.T. ARTAMA, E. SULISTYANINGSIH, S.H. POERWANTO, Y. SARI and F. BAGASKORO. 2008. Cloning and Clone Analysis of GRA1 Gene from Local Isolate *Toxoplasma gondii* Tachyzoite. *JITV* 13(1): 43-51.

The GRA1 gene of *Toxoplasma gondii* encoding protein called GRA1 protein. GRA1 protein known to be immunogenic and essentially involved in modification of parasitophorous vacuole which has role in immune evasion and virulence of organism. The local isolate of *T. gondii* is successfully isolated and known as highly pathogenic isolate similarly as its RH strain. Unfortunately, the homology sequence of GRA1 gene between those isolate still unknown. The purpose of the research are to clone the GRA1 gene and to analyze the homology from pathogenic *T. gondii* isolate and RH strain. Tachyzoite of *T. gondii* was grown in mice peritoneum by intraperitoneal injection. Then, total mRNA was isolated and purified. cDNA was synthesized from mRNA and then amplified using F1 dan R1 primers to get clone of GRA1 from local isolate. Homology analysis was performed using several bioinformatic softwares. The result showed that cDNA of GRA1 from local isolate has 84% homologs with RH strain of *T. gondii*. However, when subsequently editing performed to parts of suspected non coding sequence of cDNA GRA1 to get CDS of GRA1, the homology was increased to 100% compare to CDS of GRA1 of RH strain.

Key words: GRA1, *Toxoplasma gondii*, Cloning, Expression

ABSTRAK

SUBEKTI, D.T., W.T. ARTAMA, E. SULISTYANINGSIH, S.H. POERWANTO, Y. SARI dan F. BAGASKORO. 2008. Kloning dan Analisis Hasil Kloning Gen GRA1 dari Takizoit *Toxoplasma gondii* Isolat Lokal. *JITV* 13(1): 43-51.

Protein GRA1 disandi oleh gen *GRA1* dari takizoit *Toxoplasma gondii*. Protein GRA1 bersifat imunogenik dan memiliki peranan dalam modifikasi vakuola parasitoforus sehingga esensial untuk virulensi dan terkait dalam imunopatogenitas. Isolat lokal *T. gondii* yang telah berhasil diisolasi diketahui sangat patogen dan memiliki virulensi setara dengan galur RH. Namun homologi sekuens gen *GRA1* dan studi mendalam mengenai protein GRA1 masih belum diketahui. Hal tersebut dapat dicapai apabila telah dapat dilakukan kloning dan ekspresi dari gen *GRA1*. Tujuan penelitian adalah untuk melakukan kloning dan analisis hasil kloning terhadap gen *GRA1* dari *T. gondii* isolat lokal. Takizoit *T. gondii* isolat lokal diperbanyak di mencit. Selanjutnya total mRNA diisolasi dan dimurnikan. Amplifikasi gen *GRA1* dilakukan menggunakan sepasang primer GRA1 untuk mendapatkan cDNA *GRA1*. cDNA *GRA1* hasil kloning yang telah diperoleh dianalisis homologinya dengan cDNA *GRA1* dari *T. gondii* galur RH. Hasil analisis menunjukkan bahwa cDNA *GRA1* hasil kloning memiliki homologi 84% namun setelah dilakukan analisis editorial pada sekuens DNS diketahui memiliki homologi 100% pada CDS *GRA1*.

Kata kunci: GRA1, *Toxoplasma gondii*, Kloning, Ekspresi

PENDAHULUAN

Salah satu keberhasilan *Toxoplasma gondii* untuk dapat menginfeksi dan terhindar dari sistem imun inang disebabkan karena kemampuannya memodifikasi vakuola parasitoforus (VP) sehingga tidak dikenali oleh lisosom (SUBEKTI *et al.*, 2005). Kunci untuk dapat memodifikasi vakuola parasitoforus (VP) terletak pada protein sekretori berupa protein granula (GRA), protein

roptri (ROP) dan protein mikronema (MIC) yang bersifat solubel atau mudah larut dan disekresikan keluar oleh takizoit (BLACK dan BOOTHROYD, 2000; CEREDA *et al.*, 2005; ZHOU *et al.*, 2005). Ketiga protein tersebut akan terlibat dalam modifikasi VP yang akan menentukan imunopatogenitas, kemampuan invasi dan evasi sistem imun oleh takizoit. Salah satu protein granula yang dilaporkan imunogenik adalah GRA1 (VERCAMMEN *et al.*, 2000).

Disisi lain, isolat lokal *Toxoplasma gondii* (*T. gondii*) yang telah diisolasi diketahui menunjukkan virulensi yang setara dengan *T. gondii* galur RH pada mencit percobaan. Walaupun memiliki virulensi yang setara dan mampu membunuh 100% mencit dalam kurun waktu kurang dari 1 minggu, homologi genetiknya belum banyak dipelajari. Studi mendalam tentang homologi gen *GRA1* dan sifat protein *GRA1* yang terkait dengan modifikasi VP dan keterlibatannya dengan imunopatogenitas akan dapat dilakukan dengan baik apabila dapat diisolasi secara murni. Salah satu upaya untuk mendapatkan protein *GRA1* yang murni adalah dengan protein rekombinan melalui pendekatan kloning dan ekspresi gen penyandi protein *GRA1* (gen *GRA1*).

Umumnya prosedur kloning pada eukaryot dilakukan dengan membuat pustaka cDNA (*complementary Deoxyribonucleic acid*) dari ekspresi total mRNA (*messenger Ribonucleic acid*) yang diperoleh (SAMBROOK *et al.*, 1989). Selanjutnya dari total pustaka cDNA tersebut dilakukan penapisan satu per satu untuk menemukan gen *GRA1* yang diinginkan. Prosedur demikian sangat panjang, menghabiskan waktu serta biaya jika diterapkan pada usaha kloning dengan target gen yang sudah jelas sasarannya. Oleh sebab itu perlu dilakukan modifikasi pendekatan dan strategi kloning untuk dapat memperoleh gen target dalam waktu yang lebih singkat.

Salah satu modifikasi yang diduga dapat dilakukan adalah menggunakan primer spesifik *GRA1* yang selama ini telah diketahui berhasil digunakan untuk DNA *GRA1*. Pada organisme eukaryot, DNA (*Deoxyribonucleic Acid*) terdiri dari ekson dan intron sedangkan cDNA hanya terdiri atas ekson. Penelitian bertujuan melakukan kloning dengan mengamplifikasi gen *GRA1* dari total cDNA menggunakan sepasang primer yang digunakan untuk amplifikasi gen yang sama dari total DNA. Selanjutnya dilakukan analisis homologi hasil kloning dengan gen *GRA1 T. gondii* galur RH. Penggunaan primer tersebut diharapkan akan dapat mengamplifikasi gen target dari cDNA yang disintesis dari mRNA yang telah diisolasi. Apabila modifikasi tersebut berhasil maka langkah penapisan pustaka cDNA secara satu persatu dapat dihindari sehingga akan menghemat waktu dan biaya untuk kloning.

MATERI DAN METODE

Propagasi takizoit

Takizoit *Toxoplasma gondii* isolat lokal (disimpan beku di PAU Bioteknologi Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta) diperbanyak pada mencit Balb/C. Selanjutnya takizoit dipanen dari peritoneum dan dipurifikasi. Setelah debris dihilangkan, dilakukan sentrifugasi takizoit pada kecepatan 3000 rpm pada suhu

4°C selama 20'. Pelet yang terbentuk diresuspensi dalam PBS dan disimpan dalam -20°C sampai akan digunakan.

Isolasi total RNA dan mRNA

Isolasi total RNA dan DNA

Isolasi total RNA dan DNA dilakukan dengan teknik serupa dengan isolasi total RNA dan DNA untuk gen *ROP2* maupun gen *ROPI* (ARTAMA *et al.*, 2005; SURUDARMA *et al.*, 2006). Secara ringkas, sejumlah 1x10⁹ takizoit diresuspensi dan dicuci berulang dengan PBS pH 7,2 (mengandung 0,1% DEPC). Pelet hasil pencucian diresuspensi dengan 2 ml Guanidin tiosianat (*Denaturing solution*) dan dipindahkan kedalam tabung homogenizer serta dihomogenisasi dengan kecepatan 1200 rpm, 30", 6 siklus. Hasil homogenisasi dipindahkan ke dalam tabung steril bebas RNase, kemudian ditambah dengan Na-asetat dan didinginkan dalam es selama 5 menit diikuti penambahan fenol-kloroform (1:1). Setelah diinkubasi (4°C) selama 15 menit dilakukan sentrifugasi (4000 rpm, 4°C, 20') untuk memisahkan fase air kedalam tabung bebas RNase. Selanjutnya ditambahkan isopropanol (1:1) dan diinkubasi semalam pada -20°C. Larutan disentrifus pada 4000 rpm, 4°C, 20' dan pelet dicuci dengan etanol 75% dilanjutkan sentrifugasi pada 4000 rpm, 4°C, 25' sampai diperoleh pelet, dikeringkan serta diresuspensi dengan 250 μ l *nuclease - free water* (Promega) untuk isolasi mRNA.

Pada isolasi DNA, secara ringkas sejumlah 1x10⁹ takizoit dicuci dengan PBS dan diresuspensi dalam larutan NTE (mengandung proteinase-K 100 μ g/ml dan SDS 0,5%) kemudian diinkubasi semalam dalam *waterbath* 37°C. Selanjutnya pada campuran reaksi tersebut ditambahkan fenol 1:1 pada keadaan *continuous shaking* (60 rpm, 20'), kemudian disentrifus pada kecepatan 3000 rpm, 15'. Fase atas yang terbentuk dipindahkan ke tabung baru dan ditambahkan CIAA (kloroform-isoamil alkohol) dengan volume 1:1 dan disentrifus 3000 rpm, 10'. Fase atas ditambahkan 3 M Na-asetat (10:1) dan etanol 95% dingin (1:2) selama 15' pada -20°C. Selanjutnya disentrifus, kemudian pelet dibilas dengan alkohol 70%, dan DNA dilarutkan dalam larutan TE.

Sintesis cDNA dan amplifikasi cDNA *GRA1*

Isolasi total mRNA dan Sintesis cDNA

Isolasi mRNA dilakukan sesuai dengan petunjuk pada Kit *PolyATract mRNA Isolation System* (Promega). Kemudian dilanjutkan dengan sintesis total cDNA dari total mRNA. Sintesis cDNA dilakukan menggunakan kit *Universal Riboclone cDNA Synthesis*

System (Promega) dengan prosedur sesuai yang direkomendasi oleh produsen.

Amplifikasi cDNA dan DNA GRAI

Amplifikasi gen target yaitu gen *GRAI* dari cDNA maupun DNA menggunakan *PuRe Tags Ready to Go (RTG) PCR Beads* (Amersham Pharmacia) dengan primer F1 dan R1 (Cybergene, AB), masing masing berkonsentrasi 10 pmol/μL. Amplifikasi DNA dan cDNA dilakukan menggunakan primer dengan protokol reaksi polimerisasi yang sama. Susunan basa nukleotida untuk *forward primer* (F1) adalah 5' CGGTTTGCTTGTGTTGTTG 3' sedangkan susunan basa nukleotida *reverse primer* (R1) yaitu 5' CATGGGTACGATCACAACA 3'.

Amplifikasi dengan reaksi polimerisasi berantai (PCR = *Polymerase Chain Reaction*) dilakukan dengan Thermocycler (Gene Cyclor, BioRad). Rincian amplifikasi yang diprogramkan adalah sebagai berikut: denaturasi pertama; 94°C, 5', denaturasi kedua; 94°C, 1', annealing primer; 55°C, 1', dan polimerisasi; 72°C, 1'. Siklus reaksi polimerisasi sebanyak 35 kali, dan diakhiri polimerisasi tambahan pada 72°C, 5'. cDNA ampikon dipurifikasi untuk kloning dan sekuensing.

Kloning cDNA GRAI

Kloning cDNA *GRAI* dari takizoit *T. gondii* isolat lokal dilakukan secara bertahap yaitu ligasi pada plasmid vektor, transformasi pada *Eschericia coli* dan diakhiri dengan seleksi koloni biru-putih yang membawa plasmid dengan sisipan (*insert*) cDNA *GRAI*. Ligasi dilakukan dengan mencampur antara ampikon (cDNA *GRAI*), plasmid *pGEM-T Easy Vector*, *T4 DNA ligase* dan larutan dapar *T4 DNA ligase* serta diinkubasi pada 7°C selama semalam. Selanjutnya hasil ligasi ditransformasi pada bakteri *E. coli XL-1 Blue* yang sebelumnya terlebih dahulu dipropagasi. Transformasi dilakukan dengan teknik *heat shock*, yaitu dengan perubahan mendadak dari inkubasi pada *ice bath* ke *waterbath* (42°C). Bakteri *E. coli XL-1 Blue* yang telah ditransformasi dikultur dalam media LB (*Luria Broth medium*) dan diinkubasi dalam *continous shaker incubator* selama 1 jam pada 37°C. Sebelum dilakukan penanaman pada media agar padat, bakteri transforman disentrifus (12.000 rpm, 5") dan diresuspensi dengan 300 μL media LB.

Tahap terakhir kloning adalah seleksi koloni bakteri yang mengandung sisipan (*insert*) cDNA *GRAI* dan yang tidak mengandung sisipan. Seleksi koloni dilakukan dengan menumbuhkan bakteri transforman pada media padat LB yang mengandung X-Gal, IPTG dan antibiotika ampisilin. Koloni yang berwarna putih merupakan koloni bakteri yang mengandung sisipan

(koloni bakteri rekombinan), sedangkan yang berwarna biru merupakan koloni bakteri tanpa sisipan.

Isolasi plasmid dan sequensing hasil kloning

Plasmid rekombinan hasil kloning yang menyandi *GRAI* diisolasi dari bakteri kompeten *E. coli XL-1 Blue* menggunakan teknik isolasi plasmid alkali lisis. Pada prinsipnya, koloni bakteri *E. coli XL-1 Blue* yang mengandung plasmid rekombinan dibiakkan dalam media LB. Selanjutnya, media LB yang mengandung koloni bakteri dengan plasmid rekombinan hasil biakan tersebut dipindahkan ke tabung ependorf dan disentrifugasi pada 12.000 rpm, 30". Pelet diresuspensi dengan 100 μl *lysing solution I (TEG, Tris-EDTA-Glucose)* :1 M Tris-0,5 M EDTA-2 M glukosa) kemudian ditambahkan 200 μl *lysing solution II* (0,2 N NaOH dan 1% SDS) dan dicampur sampai homogen dan diinkubasi dalam *ice bath*. Berikutnya ditambahkan 150 μl *lysing solution III* (5 M kalium asetat, asam asetat), dihomogenisasi dan diinkubasi selama 5 menit dalam *ice bath* dilanjutkan dengan disentrifus pada 12.000 rpm, 5'.

Bagian atas dipindahkan ke tabung ependorf baru dan ditambahkan fenol:kloroform:isoamil alkohol (25:24:1) dengan perbandingan yang sama. Campuran lautan disentrifus kembali dengan kecepatan 12.000 rpm, 2'. Fase atas yang bening dipindahkan ke tabung baru dan ditambahkan etanol absolut dingin (2:1). Selanjutnya presipitasi dilakukan pada suhu -70°C selama 1 jam, diikuti dengan sentrifus pada 12.000 rpm, 5'. Pelet dibilas dengan etanol 70%, dikeringanginkan dan diresuspensi dengan TE. Plasmid yang diperoleh kemudian dielektroforesi pada agarose 1% setelah sebelumnya didigesti menggunakan enzim restriksi endonuklease *EcoRI* dan disekuensing. Sekuensi dilakukan di BPPT (Badan Pengkajian dan Penerapan Teknologi, Jakarta) menggunakan *BigDye Terminator ABI PRISM 373 DNA Sequencer*.

Analisis hasil kloning

Hasil kloning dianalisis secara deskriptif dan komparatif dengan gen *GRAI Toxoplasma gondii* galur RH yang diketahui patogen dan tersedia secara online (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Analisis hasil kloning meliputi analisis visual dengan elektroforesis pada gel agarosa serta analisis homologi sekuen cDNA *GRAI*, penentuan ORF (*open reading frame*) dan analisis homologi CDS (*coding sequences*) dari cDNA *GRAI*, dan deduksi sintesis cDNA dari DNA *GRAI*. Selain visualisasi dengan gel agarosa, seluruh analisis dilakukan dengan menggunakan program Bioinformatika yaitu CLC Bio Free Workbench 3.1. dan BioEdit 7.0.5.2. Penggunaan program GENSCAN 1.0. dan FGENES-M 1.5.0 sebagai pilihan karena

adanya fasilitas yang memungkinkan untuk menganalisis secara prediktif lokasi promotor, lokasi *splicing* dari ekson, pencarian motif CpG, penentuan ada tidaknya struktur *poly A* pada cDNA serta penentuan lokasi awal transkripsi (BANERJEE-BASU dan BAXEVANIS, 2001).

HASIL DAN PEMBAHASAN

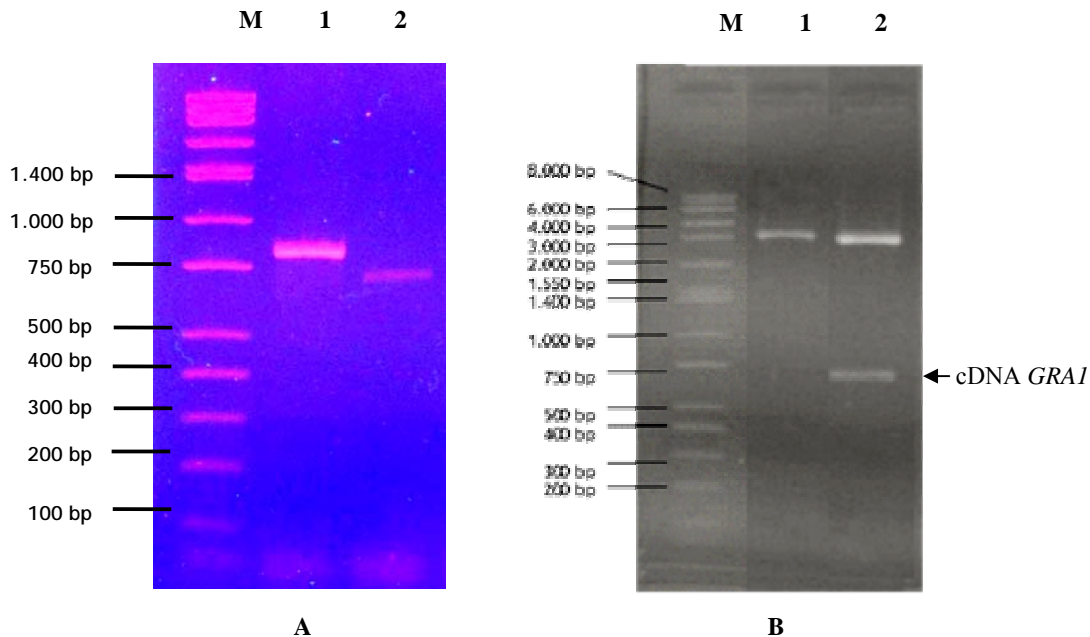
Visualisasi hasil kloning

Gen *GRA1* dapat diamplifikasi secara langsung dari DNA maupun dari cDNA dengan menggunakan sepasang primer F1 dan R1. Visualisasi kedua gen tersebut pada gel agarosa 1% juga menunjukkan perbedaan ukuran panjang basa yang dimiliki (Gambar 1A). Perbedaan panjang basa tersebut diduga disebabkan karena pada struktur DNA *GRA1* masih terdapat ekson dan intron. Sebaliknya pada struktur cDNA *GRA1* yang berasal dari mRNA *GRA1* tidak memiliki intron.

Kloning dilakukan dengan menyisipkan cDNA *GRA1* hasil amplifikasi kedalam plasmid vektor yaitu *pGEM-T Easy Vector*. Identifikasi keberhasilan kloning cDNA *GRA1* dalam plasmid *pGEM-T Easy Vector* dapat dibuktikan dengan visualisasi pada elektroforesis menggunakan gel agarosa 1% (Gambar 1B). Plasmid

dari koloni biru yang tidak mengandung sisipan cDNA *GRA1* setelah didigesti dengan enzim restriksi *EcoRI* tetap menunjukkan satu pita yang linier (Gambar 1B sumur 1). Sebaliknya, plasmid dari koloni putih yang mengandung sisipan cDNA *GRA1* setelah didigesti dengan enzim restriksi *EcoRI* menghasilkan dua pita linier yaitu plasmid *pGEM-T Easy Vector* dan cDNA *GRA1* hasil kloning (Gambar 1B sumur 2). Hasil visualisasi dengan elektroforesis pada gel agarosa 1% antara cDNA *GRA1* pada Gambar 1A (sumur 2) dengan Gambar 1B (sumur 2) menunjukkan hasil yang serupa yaitu memiliki panjang sekitar ~750 bp.

Pembuktian lebih lanjut untuk memastikan apakah cDNA yang tersisip tersebut adalah *GRA1* dan memiliki panjang ~750 bp, maka dilakukan sekuensing diikuti dengan beberapa analisis lanjut menggunakan berbagai program bioinformatik. Hasil sekuensing menunjukkan bahwa klon cDNA *GRA1* pada plasmid vektor tersebut memiliki urutan basa nukleotida 1087 bp. Panjang basa pada hasil sekuensing terhadap klon cDNA *GRA1* dalam plasmid *pGEM-T Easy Vector* tersebut ternyata jauh diatas hasil visualisasi menggunakan gel agarosa 1% yang diperkirakan berada pada kisaran 750 bp. Diduga kelebihan perbedaan pada hasil sekuensing disebabkan oleh adanya penambahan sekuen dari plasmid *pGEM-T Easy Vector* yang ikut teridentifikasi.



Gambar 1. Visualisasi hasil amplifikasi dan hasil isolasi serta digesti menggunakan enzim *EcoRI* terhadap plasmid yang mengandung isipan cDNA *GRA1* takizoit *T. gondii* menggunakan sepasang primer F1 dan R1 pada agarosa 1%
(A) Visualisasi hasil amplifikasi cDNA *GRA1* langsung dari total cDNA
M = marker; 1 = DNA *GRA1* takizoit *T. gondii*; 2 = cDNA *GRA1* takizoit *T. gondii*
(B) Visualisasi hasil isolasi dan digesti plasmid yang mengandung sisipan cDNA *GRA1*
M = marker; 1 = plasmid dari koloni biru yang didigesti enzim restriksi *EcoRI*
2 = plasmid dari koloni putih yang didigesti enzim restriksi *EcoRI*

Oleh sebab itu harus dilakukan pengeditan untuk menghilangkan sekuen basa nukleotida milik plasmid *pGEM-T Easy Vector* semaksimal mungkin. Editing dilakukan dengan menggunakan program CLC Bio Free Workbench 3.1 (CBFW 3.1) dengan melakukan identifikasi dan penghilangan sekuen yang homolog dengan milik plasmid *pGEM-T Easy Vector* melalui *pairwise alignment*. Hasil analisis menunjukkan adanya sekuen basa nukleotida yang homolog dengan plasmid *pGEM-T Easy Vector* pada bagian *upstream* dari sekuen cDNA *GRAI* sepanjang 263 bp. Konfirmasi tersebut menunjukkan bahwa panjang klon cDNA *GRAI* yang sesungguhnya setelah disekuensing diketahui memiliki panjang nukleotida 824 bp (cDNAGRA1-A pada Gambar 2).

Editing dilanjutkan dengan mengidentifikasi lokasi penempelan sepasang primer pada sekuen cDNA *GRAI* sepanjang 824 bp menggunakan CBFW 3.1. Hasil identifikasi menunjukkan bahwa didalam cDNA *GRAI* terdapat sekuen yang diapit oleh sepasang primer F1 dan R1 dengan panjang 690 bp (cDNAGRA1-F pada Gambar 2). Panjang basa nukleotida dari sekuen cDNA *GRAI* tersebut setara dengan hasil visualisasi menggunakan gel agarosa 1% yang menunjukkan panjang basa < 750 bp. Editing tersebut dicapai setelah dilakukan penghilangan sekitar 61 basa nukleotida dibagian *upstream* dan 73 basa nukleotida dibagian *downstream* di daerah terluar dari posisi 5' maupun 3' dari sekuen cDNA *GRAI* yang diapit oleh sepasang primer F1 dan R1.

Homologi cDNA *GRAI*

Pada klon cDNA *GRAI* dengan panjang basa nukleotida 824 bp merupakan hasil sekuensing yang telah diedit dari kemungkinan adanya sekuen milik plasmid vektor. Namun, diperkirakan masih terdapat sekitar 134 basa nukleotida yang berasal dari plasmid vektor di ujung amino (ujung 5') dan karboksil (ujung 3') dari sekuen klon cDNA *GRAI* tersebut (area bertanda "+" dari cDNAGRA1-A pada Gambar 2). Ke-134 basa nukleotida inilah yang menyebabkan homologi antara cDNA *GRAI T. gondii* isolat lokal (panjang basa 824 bp) dengan cDNA *GRAI* dari *T. gondii* galur RH (NCBI Sequence Data Base, accession # M26007) hanya sebesar 84% jika dianalisis dengan BioEdit 7.0.5.2. Hal tersebut disebabkan karena perhitungan besaran nilai homologi suatu sekuen gen dipengaruhi oleh jumlah basa yang identik dalam suatu urutan gen dengan jumlah basa yang berbeda dan tidak bersesuaian (*gap*) dari suatu urutan gen yang dibandingkan dan dikonversi menjadi skor matriks (KUPPUSWAMY dan SUBRAMANIAN, 2006).

Sebaliknya pada klon cDNA *GRAI* dengan panjang basa 690, kelebihan 134 basa nukleotida tersebut dihilangkan karena berada di posisi terluar dari lokasi

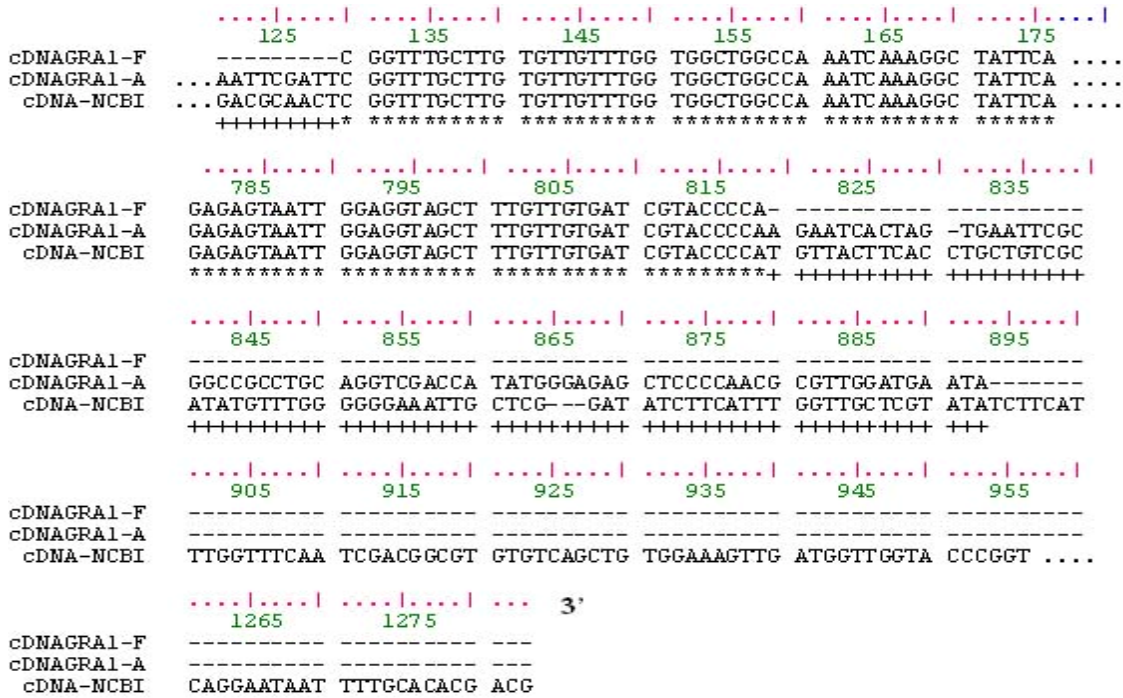
penempelan primer F1 (pada ujung 5' dari sekuen klon cDNA *GRAI*) dan R1 (pada ujung 3' dari sekuen klon cDNA *GRAI*). Sekuen klon cDNA *GRAI* dengan panjang basa 690 bp yang posisinya berada atau diapit sepasang primer F1 dan R1 ini merupakan sekuen inti dari klon cDNA *GRAI* yang sesungguhnya diperoleh dalam penelitian ini (area bertanda "*" pada Gambar 2). Hal ini disebabkan jumlah pasang basa nukleotidanya konsisten dan sesuai dengan visualisasi hasil dari elektroforesis pada gel agarosa 1% (Gambar 1) dan memiliki homologi 100% dengan sekuen cDNA *GRAI* dari *T. gondii* galur RH (NCBI Sequence Data Base, accession # M26007) pada posisi basa ke-129 sampai ke-819 (Gambar 2).

Penentuan ORF dan homologi CDS dari cDNA *GRAI*

Walaupun analisis homologi antara sekuen klon cDNA *GRAI* dengan panjang basa 824 bp maupun 690 bp menunjukkan hasil yang berbeda terhadap cDNA *GRAI* (NCBI Sequence Data Base, accession # M26007), analisis homologi terhadap CDS (*coding sequence*) kedua klon cDNA *GRAI* tetap serupa. Analisis homologi terhadap CDS cDNA *GRAI* hanya dapat dilakukan apabila telah diketahui posisi dari ORF (*open reading frame*) dalam sekuen klon tersebut. Oleh sebab itu terlebih dahulu harus ditetapkan lokasi posisi ORF dari cDNA *GRAI*. ORF akan menentukan lokasi kodon awal (*start codon*) dan kodon terminasi (*stop codon*) dari suatu gen. Berdasarkan posisi kodon awal dan terminasi dari suatu gen akan dapat menentukan CDS dari gen yang akan ditranslasi menjadi protein.

Penentuan lokasi ORF dari sekuen cDNA *GRAI T. gondii* isolat lokal maupun galur RH dilakukan dengan menggunakan program GENSCAN, FGENES-M maupun CLC Bio Free Workbench 3.1. Analisis dengan ketiga program tersebut menghasilkan kesepakatan dan kesamaan prediksi untuk menentukan lokasi ORF dari cDNA *GRAI*. Hasil analisis menunjukkan bahwa ORF untuk klon cDNA *GRAI* (panjang basa 824 bp) berada pada posisi basa ke-148 sampai basa ke-720 sedangkan untuk klon cDNA *GRAI* yang memiliki panjang basa 690 bp berada pada posisi basa ke-87 sampai basa ke-659.

Walaupun memiliki posisi kodon awal dan kodon terminasi yang berbeda dalam penentuan ORF, CDS yang dihasilkan, kedua sekuen klon cDNA *GRAI* tersebut memiliki panjang basa yang sama yaitu 573 bp dan 100% homolog. Demikian pula halnya dengan hasil analisis homologi sekuen antara CDS dari klon cDNA *GRAI T. gondii* isolat lokal dengan CDS dari cDNA *GRAI T. gondii* galur RH menggunakan BioEdit 7.0.5.2 dan CLC Bio Free Workbench 3.1. menunjukkan kesamaan pada tingkat 100%. Hal



Gambar 2. Analisis homologi sekuen cDNA *GRA1* *T. gondii* isolat lokal dengan cDNA *GRA1* *T. gondii* galur RH dari Gene Bank

Keterangan: cDNAGRA1-F = sekuen klon cDNA *GRA1* dari *T. gondii* isolat lokal dengan panjang 690 bp
 cDNAGRA1-A = sekuen klon cDNA *GRA1* dari *T. gondii* isolat lokal dengan panjang 824 bp
 cDNA-NCBI = sekuen cDNA *GRA1* dari *T. gondii* galur RH dalam Gene Bank (NCBI Sequence Data Base, accession # M26007)
 "+" merupakan sekuen tambahan dengan panjang 134 bp pada *upstream* dan *downstream* dari sekuen cDNA *GRA1* *T. gondii* (cDNAGRA1-A dan cDNA-NCBI) yang berasal dari / milik plasmid vektor
 "*" merupakan sekuen inti cDNA hasil kloning yang diapit primer F1 dan R1

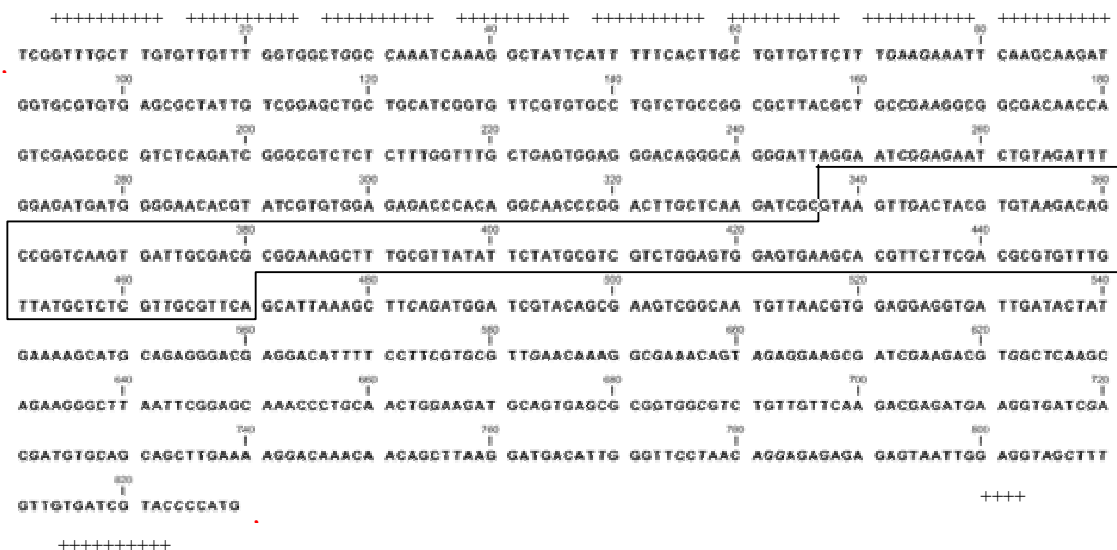
tersebut bermakna bahwa hasil kloning dari cDNA *T. gondii* isolat lokal dengan menggunakan sepasang primer F1 dan R1 secara meyakinkan telah dapat mengamplifikasi dan mendapatkan *full length sequence* (gen yang utuh dan fungsional) untuk gen *GRA1* baik secara langsung dari total genom maupun dari pustaka cDNA yang disintesis dari RNA. Oleh karena sekuen CDS dari hasil kloning memiliki homologi 100% dengan gen *GRA1* dari *T. gondii* galur RH., dapat dipastikan memiliki sekuen peptida yang sama untuk protein *GRA1* jika dilakukan translasi terhadap kodon dalam CDS tersebut.

Deduksi pembentukan cDNA dari DNA *GRA1*

Pada Gambar 2 telah diketahui bahwa antara DNA *GRA1* dengan cDNA *GRA1* ternyata memiliki perbedaan panjang basa yang tidak terlalu besar. Hal ini menimbulkan pertanyaan apakah amplifikasi menggunakan sepasang primer F1 dan R1 yang dilakukan tersebut memang tepat untuk mendapatkan gen utuh dari DNA *GRA1* *T. gondii* yang memiliki intron dan ekson. Hasil sekuensing memperlihatkan bahwa panjang basa nukleotida dari DNA *GRA1* sesungguhnya adalah 1120 bp. Hal ini sangat berbeda

dengan visualisasi hasil elektroforesis menggunakan gel agarosa 1% yang terlihat berada pada kisaran panjang basa ~750 – 800 bp. Setelah dilakukan editing bertahap dengan cara serupa seperti editing pada cDNA untuk menghilangkan sekuen milik plasmid vektor ternyata diperoleh panjang riil dari DNA *GRA1* adalah 829 bp. Panjang basa nukleotida tersebut bersesuaian dengan panjang basa pada visualisasi hasil elektroforesis dari DNA *GRA1* dalam Gambar 1.

Pembuktian terbalik terhadap DNA *GRA1* dilakukan untuk menguji apakah gen tersebut memiliki lokasi *splicing* yang akan menghasilkan CDS *GRA1* yang sama dengan CDS *GRA1* hasil determinasi dari penentuan ORF pada klon cDNA *GRA1*. Analisis dengan menggunakan GENSCAN 1.0 dan FGENES-M 1.5.0 memiliki kesamaan hasil yang menunjukkan bahwa ekson pertama (ekson1) dari DNA *GRA1* berada pada basa ke-89 sampai basa ke-336 (panjang basa 248 bp). Adapun ekson kedua (ekson2) dari DNA *GRA1* berada pada posisi basa ke-472 sampai basa ke-796 (panjang basa 325 bp). Dengan demikian, total panjang ekson (ekson1+ekson2) setelah *splicing* untuk penghilangan intron (panjang basa 135 bp) dari DNA *GRA1* adalah sepanjang 573 bp yang sesuai dengan panjang CDS dalam cDNA *GRA1* (Gambar 3).



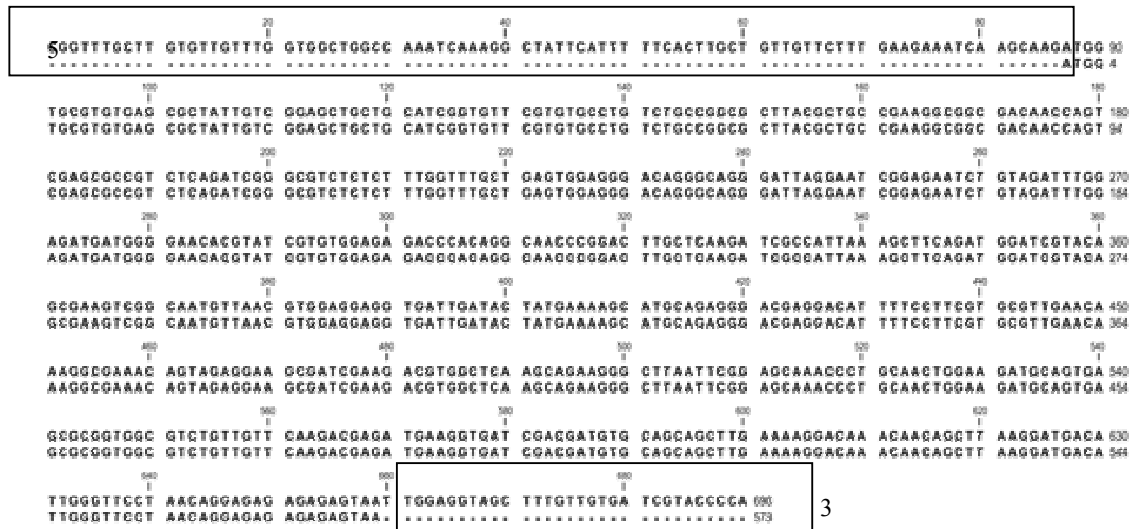
Gambar 3. Sekuen DNA *GRA1 T. gondii* isolat lokal (full length sequence)
Keterangan: Area dengan tanda "+" = non coding sequence dari ekson
 Area tanpa tanda = coding sequence dari ekson
 Area dalam kotak = intron

Hasil analisis dari DNA *GRA1* berupa ekson setelah dilakukan *splicing* terhadap intron, sedangkan hasil analisis pada cDNA *GRA1* berupa CDS dan bukan panjang total basa dalam sekuen cDNA. Telah diketahui bahwa didalam cDNA tidak terdapat intron, dengan demikian seharusnya panjang ekson hasil *splicing* pada DNA *GRA1* memiliki panjang basa yang sama dengan cDNA *GRA1* dan bukan dengan CDS dari cDNA *GRA1*. Fakta dari hasil penelitian ini memperlihatkan bahwa apabila terdapat perbedaan antara hasil analisis dari prediksi menggunakan suatu program bioinformatik haruslah dikaji ulang kausanya.

Pada analisis dengan GENSCAN 1.0 dan FGENES-M 1.5.0, hasil analisis menunjukkan bahwa lokasi *splicing* pada sekuen DNA *GRA1* akan menghasilkan ekson yang memiliki panjang basa nukleotida sama dengan CDS dari cDNA *GRA1* yaitu 573 bp. Sebaliknya hasil kloning, sekuensing dan editing menggunakan program CBFW 3.1 terhadap sekuen dari klon cDNA *GRA1* menunjukkan adanya ekson sepanjang 690 bp. Demikian pula halnya dengan DNA *GRA1*, jika hanya wilayah intron (area didalam kotak pada Gambar 3) saja yang dihilangkan akan menghasilkan panjang basa nukleotida yang sama dengan cDNA *GRA1*.

Selisih panjang basa nukleotida sepanjang 117 bp tersebut (selisih antara 690 bp dengan 573 bp) ternyata non coding sequence dalam struktur ekson gen *GRA1 T.*

gondii isolat lokal. Kepastian bahwa sekuen tersebut adalah non CDS diperoleh setelah hasil analisis terhadap lokasi ORF dan CDS menggunakan ketiga program (GENSCAN 1.0., FGENES-M 1.5.0 dan CBFW 3.1) tersebut menunjukkan hasil yang sama. Pada dasarnya CDS merupakan ekson fungsional yang berisi kode genetik untuk ditranslasi menjadi protein *GRA1*. Sebaliknya tidak semua kodon dalam ekson akan mengkode suatu protein fungsional atau tidak selalu bahwa seluruh sekuen dalam ekson adalah CDS. Penentuan lokasi kodon fungsional dalam sekuen ekson sangat ditentukan oleh ada tidaknya ORF dan CDSnya. Pada organisme eukaryot, adanya sekuen ekson yang tidak fungsional (non coding sequence) telah dilaporkan oleh ALBERTS *et al.* (1994). Fakta tersebut membuktikan bahwa pada organisme eukaryot, walaupun intron telah dihilangkan pada saat sintesis RNA, non coding sequence yang lain kemungkinan juga masih dapat ditemukan didalam ekson (ekson non CDS). Hal ini menyebabkan beberapa hasil amplifikasi terhadap cDNA tertentu yang disintesis dari RNA, selain CDS tetap akan dijumpai ekson non CDS. Pada cDNA *GRA1* panjang basa nukleotida ekson non CDS adalah 86 bp pada bagian *upstream* (pada posisi 5') dan 31 bp pada bagian *downstream* (pada posisi 3') dari CDS dalam cDNA *GRA1* (area didalam kotak pada Gambar 4).



Gambar 4. Sekuen utuh (full length sequence) DNA *GRA1* tanpa intron yang identik dengan cDNA *GRA1* dari *T. gondii* isolat lokal

Keterangan : Area dalam kotak = non coding sequence dari ekson
Area diantara kotak = coding sequence dari ekson

KESIMPULAN

Kloning yang telah dilakukan dapat secara khusus mengklon gen *GRA1* dari *T. gondii* isolat lokal walaupun menggunakan sepasang primer yang didesain untuk DNA *GRA1*. Secara keseluruhan gen *GRA1* dari *T. gondii* isolat lokal yang dikloning (cDNA *GRA1*) menunjukkan homologi CDS sebesar 100% atau identik dengan gen *GRA1* *T. gondii* galur RH. Pada cDNA *GRA1* disamping CDS juga terdapat ekson non CDS.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih disampaikan kepada pihak PAU Bioteknologi UGM yang telah membantu dalam berbagai fasilitas dan peralatan untuk terlaksananya penelitian. Penelitian didanai melalui Proyek Penelitian Riset Unggulan Terpadu (RUT) XI tahun 2004/2005 – 2006/2007 (WTA, DTS dan SHP).

DAFTAR PUSTAKA

ALBERTS, B., D. BRAY, J. LEWIS, M. RAFF, K. ROBERTS and J.D. WATSON. 1994. *Molecular Biology of The Cell* 3rd Ed. Garland Publishing, New York. pp. 551-594.

ARTAMA, W.T., Y. SARI, D.T. SUBEKTI, S.H. POERWANTO and J. SUBANDONO. 2005. Cloning and Sequencing cDNA Encoding for Rhopty-2 *Toxoplasma gondii* Tachyzoite Local Isolate. *Indonesian J. Biotech.* 10 : 840 – 847.

BANERJEE-BASU, S. and A.D. BAXEVANIS. 2001. *Predictive methods using protein sequences In Bioinformatics, A*

practical guide to the analysis of genes and proteins. Wiley and Sons Inc. Bremen. p. 272 – 273.

BLACK, M.W. and J.C. BOOTHROYD. 2000. Lytic cycle of *Toxoplasma gondii*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 64: 607 – 623.

CEREDE, O., J.F. DUBREMETZ, M. SOETE, D. DESLEE, H. VIAL, D. BOUT and M. LEBRUN. 2005. Synergistic Role of Micronemal Proteins in *Toxoplasma gondii* Virulence. *J. Exp. Med.* 201: 453 – 463.

KUPPUSWAMY, C. and C. SUBRAMANIAN. 2006. *Encyclopedia of Bioinformatics Vol. 5.* Dominant Publisher, New Delhi.

SAMBROOK, J., E.F. FRICH and T. MANIATIS. 1989. *Molecular Cloning, A Laboratory Manual.* 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York

SUBEKTI, D.T., W.T. ARTAMA dan T. ISKANDAR. 2005. Perkembangan Kasus dan Teknologi Diagnosis Toksoplasmosis. Proseding Lokakarya Nasional Penyakit Zoonosis. Bogor, 15 September 2005. Pusat Penelitian dan Pengembangan Peternakan – Badan Penelitian dan Pengembangan Pertanian Departemen Pertanian. Bogor. hlm. 253 – 264.

SURUDARMA, I. W., D.T. SUBEKTI, S. MOELJOPAWIRO and W.T. ARTAMA. 2006. Cloning Gene Encoding Rhopty 1 (ROP1) Protein of *Toxoplasma gondii* Tachyzoite Local Isolate. *Indonesian J. Biotech.* 11: 884 – 888.

STRYER, L. 1998. *Biochemistry.* W.H. Freeman Co. New York.

VERCAMMEN, M., T. SCORZA, K. HUYGEN, J. DE BRAEKELEER, R. DIET, D. JACOBS, E. SAMAN and H. VERSCHUEREN. 2000. DNA vaccination with genes encoding

Toxoplasma gondii antigens GRA1, GRA7, and ROP2 induces partially protective immunity against lethal challenge in mice. *Infect. Immun.* 68: 38 – 45.

ZHOU, X.W., B.F.C. KAFSACK, R.N. COLE, P. BECKETT, R.F. SHEN and V.B. CARRUTHERS. 2005. The Opportunistic

Pathogen *Toxoplasma gondii* Deploys A Diverse Legion of Invasion and Survival Proteins. *J. Biol. Chem.* 280: 34233 – 34244.