

VERIFIKASI cDNA T29 SEBAGAI KANDIDAT GEN PENGKODE PROTEIN *Toxoplasma gondii* DENGAN METODE SDS PAGE

Ira Djajanegara*, Wayan Artama**, Retno Lestari***, Sabar Pambudi****

*) P3T Bioindustri BPPT

***) PAU-Bioteknologi UGM

****) Departemen Biologi UI

*****) P3T Farmasi Medika BPPT

ABSTRACT

The process of cDNA construction from mRNA isolated from *Toxoplasma gondii* has been done. There were 7 candidates cDNA which one of them is called T29. Since *Toxoplasma gondii* is the cause of toxoplasmosis infection, cloning the gene encoding protein from this parasite provides an important tool for developing diagnostic kit for detection of toxoplasmosis. Digestion of the cDNA T29 with *EcoRI* which is the restriction site where the cDNA was inserted yielded a 1.862 bp fragment. The fragment was subcloned into *E. coli* expression vector pMal-p2x and transformed into *E. coli* strain TB1. Colonies of TB1 were grown on ampicillin plates and the recombinant plasmid was extracted using the standard procedure. The plasmid was digested using *EcoRI* and *PstI*, checked by PCR amplification using *malE* and M13/pUC primers. The recombinant plasmid was expressed in TB1 and the protein extracted was ran in SDS PAGE to observe the presence of the expressed protein. Based on the data from this experiment, there was no expression result of the expressed cDNA which was confirm by the PCR result. Therefore, it was concluded that cDNA T29 was not carrying the gene coding for protein from parasite *Toxoplasma gondii*.

Key words: cDNA, *E. coli* TB1, pMal-p2x, *Toxoplasma gondii*, verification

PENGANTAR

Analisis *complementary deoxyribose nucleate* (cDNA) mampu memberikan gambaran aktivitas spesifik suatu gen, karena cDNA merupakan kopi dari rantai *messenger RNA* (mRNA) yang hanya terdiri dari bagian gen yang fungsional. Tanpa bagian yang tidak tereksprei (*intron*), gen yang terkandung dalam cDNA dapat diekspresikan dengan mengklonkannya ke berbagai inang lain sehingga ekspresi protein dari sekuens asam amino oleh gen yang diidentifikasi melalui cDNA juga dapat diketahui (Paolella, 1998; Lodish *et al.*, 2000).

Terminologi ekspresi protein dapat berarti akumulasi dari protein yang dikode oleh suatu gen pada sistem ekspresi tertentu, yang dipengaruhi oleh berbagai faktor. Faktor-faktor tersebut adalah transkripsi dan translasi gen, stabilitas sistem ekspresi, mRNA, protein yang diekspresikan, serta sifat fisiologis dari sel inang yang digunakan (Bogosian *et al.*, 1991).

Ekspresi protein cDNA bermanfaat dalam melakukan verifikasi keberhasilan isolasi suatu gen. Ekspresi protein dalam bentuk antigen dari organisme eukariot dalam jumlah besar dan cepat pada *Escherichia coli* (*E. coli*) dapat dilakukan. Penggunaan *E. coli* dalam mengekspresikan suatu gen didasarkan karena beberapa hal, yaitu *E. coli* memiliki database genetik, fisiologi, dan biokimia yang lengkap dibandingkan organisme yang lain. Selain itu *E. coli* juga

dapat tumbuh pada medium yang sederhana dan relatif tidak mahal, serta aman untuk lingkungan apabila digunakan untuk fermentasi skala besar. Namun, protein yang diekspresikan tersebut mungkin tidak aktif karena bakteri tidak memiliki mekanisme post-translasi protein sebagaimana organisme eukariotik (Bogosian *et al.*, 1991; Goeddel, 1990; Giddings *et al.*, 2000).

Gen perlu disisipkan dalam suatu vektor ekspresi untuk dapat mempelajari protein yang dikode oleh basa-basanya (Griffiths *et al.*, 2000). Berbeda dengan vektor lain, vektor ekspresi memiliki promoter sebagai tempat penempelan RNA polimerase bakteri yang akan menginisiasi proses translasi. Promoter tersebut umumnya bersifat inducibel sehingga waktu dan tingkat ekspresi protein dapat diatur. Selain itu, vektor ekspresi juga perlu memiliki sekuens Shine-Dalgarno, agar ribosom bakteri dapat berikatan dengan mRNA dan mentranslasikannya (Fairbanks & Andersen, 1999; Lodish *et al.*, 2000).

Beberapa vektor ekspresi dirancang untuk mengekspresikan gen *insert* menjadi protein dalam bentuk protein fusi. Protein hasil ekspresi tersebut berikatan dengan suatu protein stabil yang dikenali oleh sel inang sehingga mencegah degradasi protein yang diekspresikan oleh gen *insert* oleh protease inang. Kelebihan lain dari protein fusi adalah protein tersebut umumnya akan dihasilkan dalam jumlah besar dan dapat dengan mudah dipurifikasi melalui pemotongan oleh suatu protease (Glick & Pasternak, 1998).

Melalui teknik analisis cDNA, telah dilakukan pengembangan protein rekombinan yang potensial dalam standarisasi diagnosis penyakit infeksi parasit. Protein antigen rekombinan merupakan protein parasit yang dihasilkan melalui ekspresi cDNA dari parasit tersebut (contohnya *T. gondii*) dalam sistem ekspresi prokariot maupun eukariot. Antigen rekombinan bersifat imunoreaktif dan murni sehingga memberikan hasil diagnosis yang lebih akurat (Aubert *et al.*, 2000; Li *et al.*, 2000).

Infeksi *T. gondii* pada manusia yang sehat tidak menimbulkan penyakit, namun infeksi toksoplasmosis sangat berbahaya bagi janin dan individu dengan sistem imun yang tertekan (Vercamen *et al.*, 2000). Infeksi toksoplasmosis menyebabkan lesi permanen susunan saraf pusat dan mata, nekrosis dan kalsifikasi susunan saraf pusat, peradangan fokal, bahkan kematian. Janin yang terinfeksi parasit tersebut akan lahir sebagai individu dengan gejala eritroblastosis, hidrops fetalis, retinokoroiditis, kalsifikasi intrakranial, kelainan psikomotorik, retardasi mental, hepatosplenomegali, ikterus, serta limfadenopati. Infeksi *T. gondii* pada kehamilan muda dapat menyebabkan abortus atau lahir mati (Gandahusada, 1998).

Telah dilakukan penelitian terhadap beberapa protein *T. gondii* yang bersifat imunoreaktif dalam bentuk antigen rekombinan, di antaranya antigen membran, antigen granula padat, dan antigen *rho*ptry (Aubert *et al.*, 2000). Penelitian pendahuluan yang belum dipublikasikan menghasilkan beberapa cDNA yang diduga mengandung gen pengkode protein dari *T. gondii* isolat lokal. Salah satu cDNA yang diperoleh adalah cDNA T29. Penelitian yang dilakukan bertujuan untuk melakukan verifikasi protein yang dihasilkan dari cDNA T29 dengan metode SDS PAGE.

BAHAN DAN CARA KERJA

Sampel untuk verifikasi cDNA merupakan hasil transkripsi balik mRNA takizoit *Toxoplasma gondii* isolat lokal yang disisipkan ke dalam suatu vektor pada situs restriksi *EcoRI*.

Bakteri yang digunakan sebagai sel inang adalah stok *E. coli* TB1 (New England Biolabs) yang disimpan dalam medium gliserol dengan konsentrasi akhir 15% (v/v) dan disimpan dalam *deep freezer* -70°C (*bacteriological storage*).

Vektor pengklonaan yang digunakan dalam penelitian adalah fagemid pMal-p2x (New England Biolabs) sebagai vektor ekspresi.

Pembuatan sel kompeten dengan metode kalsium klorida dan transformasi Pembuatan sel kompeten dan transformasi dengan kalsium klorida dilakukan berdasarkan modifikasi metode Sambrook dan Russell (2001).

Transformasi dilakukan dengan memasukkan 5 ml vektor rekombinan. Campuran tersebut diinkubasi di atas es selama 45 menit, lalu campuran tersebut dipindahkan ke dalam *water bath* bertemperatur 42°C dan diinkubasi selama 90 detik. Campuran segera dipindahkan ke atas es dan diinkubasi kembali selama 2–3 menit. Ke dalam campuran ditambahkan 200 ml medium LB cair, kemudian campuran tersebut diinkubasi menggunakan *water bath shaker* pada kecepatan 250 rpm dengan temperatur 37°C selama 1 jam. Sebanyak 100 ml suspensi bakteri disebar pada medium LB agar yang mengandung ampisilin, 5-Bromo-3-Indolyl b-D- galactopyranoside (X-Gal), dan 5-Iodo-3-Indolyl-b-D-galactopyranoside (IPTG). Kultur tersebut diinkubasi pada temperatur 37°C selama 12–16 jam.

Kontrol negatif transformasi berupa sel kompeten yang diberi perlakuan transformasi tanpa penambahan vektor rekombinan. Kontrol negatif disebar pada medium LB agar dan LB agar ampisilin.

Isolasi plasmid rekombinan dengan metode minipreparasi

Isolasi plasmid rekombinan dengan metode minipreparasi dilakukan berdasarkan metode Sambrook & Russell (2001). Koloni tunggal *E. coli* yang berwarna putih pada medium LB agar yang mengandung ampisilin, X-Gal, dan IPTG diinokulasikan ke dalam 5 ml medium LB cair ampisilin, kemudian diinkubasi pada temperatur 37°C semalaman. Sel dipanen dan dilisis dengan larutan lisis alkalin I dingin, larutan lisis alkalin II, dan larutan lisis alkalin III. Larutan hasil pelisisan dengan larutan pelisis dicuci dengan larutan fenol: kloroform dengan perbandingan 1 : 1 serta etanol 100% dan etanol 70%. Kemudian pelet isolat plasmid disuspensikan kembali dalam 30 ml dd H_2O steril dan disimpan pada temperatur -20°C .

Ligasi insert ke vektor ekspresi

Reaksi ligasi dilakukan berdasarkan modifikasi metode KPP Bioteknologi ITB (2004). Ke dalam tabung mikrosentrifus dimasukkan 0,3 ml enzim DNA ligase T4, 1 ml dapar enzim DNA ligase T4, serta vektor dan *insert* dengan perbandingan vektor: *insert* sebesar 1 : 2. Volume reaksi ditetapkan menjadi 10 ml dengan penambahan dd H_2O steril. Campuran diinkubasi selama 12–16 jam pada temperatur 4°C . Kontrol reaksi ligasi berupa campuran reaksi tanpa penambahan *insert*.

Induksi ekspresi protein dengan IPTG

Induksi ekspresi protein dilakukan berdasarkan metode Sambrook & Russell (2001). Kultur koloni yang berwarna putih diinokulasikan ke dalam LB cair ampisilin kemudian

diinkubasi semalaman pada temperatur 37 °C. Sebanyak 50 ml kultur tersebut, diinkubasi dalam 5 ml LB cair ampisilin pada temperatur 37 °C hingga kerapatan sel pada A_{550} mencapai 0,5–1. Setelah kerapatan sel tersebut tercapai, 1 ml kultur dipindahkan ke dalam tabung mikrosentrifus sebagai kultur 0 jam. Sisa kultur diinduksi dengan penambahan IPTG hingga 0,3 mM dan inkubasi dilanjutkan hingga 2 jam. Setelah kerapatan sel masing-masing kultur diukur pada A_{550} , sebanyak 1 ml masing-masing kultur tersebut dipindahkan ke tabung mikrosentrifus. Sel dipanen dengan membuang supernatan yang terbentuk setelah proses sentrifus menggunakan kecepatan 13.000 rpm selama 1 menit pada temperatur ruang.

Pelet hasil sentrifus disuspensikan dalam 100 ml 1 × dapar *loading* gel SDS dan dipanaskan pada temperatur 100 °C selama 3 menit, lalu disentrifus dengan kecepatan 13.000 rpm selama 1 menit pada temperatur ruang. Seluruh sampel disimpan pada temperatur –20 °C hingga semua sampel siap dimasukkan dalam gel. Sebelum dimasukkan ke dalam gel poliakrilamida, sampel dibiarkan hingga mencapai temperatur ruang. Kontrol positif ekspresi protein berupa induksi IPTG terhadap bakteri yang membawa vektor tanpa *insert*. Kontrol negatif berupa perlakuan ekspresi tanpa penambahan IPTG terhadap bakteri dengan vektor non-rekombinan maupun rekombinan.

Sodium Dodecyl Sulfate (SDS-PAGE)

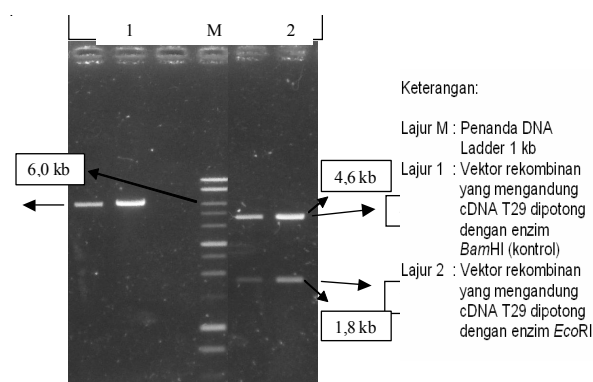
Elektroforesis gel poliakrilamida dilakukan berdasarkan metode Sambrook & Russell (2001). Sebanyak 5 ml larutan gel pemisah 7,5% dimasukkan ke dalam plat kaca elektroforesis. Gel pemisah segera dilapisi dengan penambahan air ke dalam pelat. Setelah gel pemisah membeku, lapisan air dibuang dan sebanyak 3 ml larutan gel penumpuk 5% dimasukkan ke dalam plat sehingga terbentuk gel elektroforesis (GE). Kemudian sisir segera dimasukkan dan diangkat setelah gel penumpuk membeku sehingga tercetak sumur-sumur GE. Dapur elektroforesis dimasukkan ke dalam piranti GE bagian bawah. Plat yang berisi GE dimasukkan ke dalam piranti GE sampai tidak ada gelembung udara lagi. Kemudian dapur elektroforesis dimasukkan ke dalam piranti GE bagian atas sampai GE terendam oleh dapur elektroforesis.

Selanjutnya penanda protein dan sampel yang telah dicampur dengan 1 x SDS-dapur *loading* dipanaskan selama 3 menit pada temperatur 100° C dan masing-masing campuran dimasukkan sebanyak 15 ml ke dalam tiap sumur. Elektroforesis dijalankan pada tegangan 100 V dan arus listrik 100 A selama 1,5 jam. Setelah proses elektroforesis

selesai, GE direndam dengan larutan *staining* selama setengah jam pada temperatur ruang. Gel elektroforesis kemudian dibilas beberapa kali dengan larutan *destaining* dan diinkubasi dalam larutan tersebut selama semalaman. Berat molekul pita protein yang terbentuk diketahui dengan program komputer Kodak 1D 3.6.

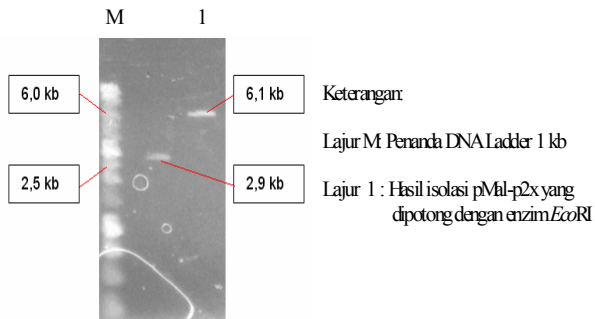
HASIL

Fragmen *insert* cDNA T29 diisolasi dari vektor dengan enzim *EcoRI*, karena cDNA T29 disisipkan ke dalam vektor pada situs *EcoRI*. Hasil digesti yang divisualisasikan dengan elektroforesis gel agarosa 1% menunjukkan keberhasilan isolasi *insert* cDNA. *Insert* cDNA T29 berukuran 1.862 bp dapat diisolasi dari vektor berukuran 4.678 bp. Hasil tersebut dikonfirmasi dengan pemotongan vektor rekombinan menggunakan enzim *BamHI* yang menghasilkan pita linier sebesar 6.000 bp (Gambar 1).



Gambar 1. Hasil elektroforesis isolasi *insert* cDNA T29 dengan enzim *EcoRI*

Ligasi cDNA T29 dengan plasmid pMal-p2x dilakukan dengan enzim DNA ligase T4. Plasmid pMal-p2x merupakan plasmid ekspresi protein *insert* sebesar 6,7 kb. Dalam sistem bakteri, plasmid tersebut akan mengekspresikan protein *insert* yang berfusi dengan protein yang dikode oleh gen *malE* pada plasmid pMal-p2x, yaitu *maltose-binding protein* (MBP) (Sambrook & Russell, 2001). Dalam bentuk protein fusi, protein *insert* akan terhindar dari degradasi oleh protease sel inang dan mudah untuk dilakukan purifikasi lebih lanjut (Glick & Pasternak, 1998). Ujung lengket yang komplemen dengan adaptor pada cDNA T29 diperoleh melalui proses digesti plasmid pMal-p2x dengan menggunakan enzim *EcoRI*. Pemotongan tersebut membentuk plasmid linier yang tampak sebagai pita berukuran 6.130 bp pada gel agarosa 1% (Gambar 2, lajur 1).



Gambar 2. Hasil elektroforesis fagemid plasmid pMal-p2x yang dilinierkan dengan enzim *EcoRI*

Hasil ligasi cDNA T29 dengan plasmid pMal-p2x ditransformasikan ke dalam *E. coli* TB1 (Gambar 3). *Escherichia coli* TB1 tidak menghasilkan protease sehingga protein *insert* yang diekspresikan oleh plasmid tidak terdegradasi. Selain itu, *E. coli* TB1 merupakan galur yang direkomendasikan dalam penggunaan pMal-p2x, karena mampu mempertahankan stabilitas plasmid tersebut di dalam selnya (New England Biolabs, 2003).

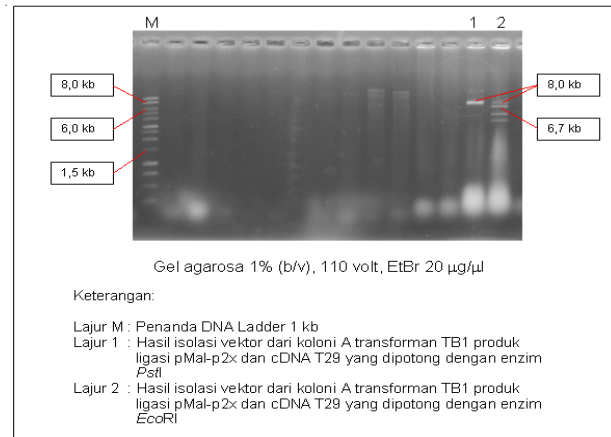


Gambar 3. Transforman *E. coli* TB1 dengan hasil ligasi pMal-P2x dan cDNA T29 yang tumbuh pada medium penapisan ampisilin.

Penapisan transforman hasil ligasi cDNA T29 dengan pMal-p2x tidak dilakukan dengan teknik α -komplementasi, karena tidak tersedianya X-Gal pada saat proses transformasi dilakukan. Selain itu, teknik α -komplementasi membutuhkan penambahan IPTG pada medium LB agar. Adanya IPTG pada medium akan menyebabkan induksi ekspresi protein plasmid secara berlebihan. Akibatnya, sel bakteri yang mengandung plasmid akan mati dan tidak dapat diperbanyak (New England Biolabs, 2003). Dengan demikian, seleksi yang dilakukan pada medium LB agar ampisilin akan memberikan hasil berupa pertumbuhan koloni-koloni bakteri yang membawa plasmid pMal-p2x, baik yang telah mengalami ligasi dengan *insert* cDNA T29

maupun tidak. Akibatnya, penapisan dengan enzim restriksi dilakukan terhadap semua koloni yang terbentuk.

Penapisan dengan reaksi digesti dilakukan dengan 2 enzim restriksi, yaitu *PstI* dan *EcoRI*. Enzim restriksi *PstI* akan memotong plasmid rekombinan pada satu situs restriksi sehingga vektor rekombinan menjadi linier. Salah satu koloni transforman memberikan hasil positif pemotongan plasmid rekombinannya dengan enzim *PstI*, yaitu berupa pita tunggal berukuran 8.000 bp pada gel agarosa 1% (Gambar 4, lajur 1).



Gambar 4. Hasil elektroforesis penyeleksian plasmid pMal-p2x rekombinan dengan enzim restriksi *EcoRI* dan *PstI*

Pemotongan plasmid yang sama dengan enzim *EcoRI* menghasilkan beberapa pita yang tidak spesifik. Pemotongan tidak spesifik tersebut mungkin disebabkan oleh perubahan aktivitas enzim *EcoRI* yang digunakan akibat ketidakstabilan temperatur penyimpanan enzim tersebut (Bloch & Grossmann, 1994). Lajur 2 yang terdapat pada Gambar 4 memperlihatkan adanya pita berukuran 8.000 bp yang diduga sebagai plasmid yang baru terpotong pada salah satu situs restriksi *EcoRI* plasmid rekombinan dan pita berukuran 6.720 bp yang diduga sebagai plasmid pMal-p2x yang berhasil terpotong sempurna.

Insert cDNA T29 yang berukuran 1,8 kb tidak dapat terlihat karena terhalang oleh *smear* RNA (Gambar 4, lajur 2). Menurut Towner (1991), kontaminasi RNA dalam sampel vektor sebenarnya tidak akan mengganggu reaksi digesti yang dilakukan, sehingga isolasi vektor dengan metode lisis alkalin dapat dilakukan tanpa penambahan RNase. Namun pada percobaan, pita DNA yang divisualisasikan dengan gel agarosa nampak tertutup oleh RNA. Oleh karena itu, dilakukan penambahan RNase pada campuran reaksi digesti. Setelah penambahan RNase pada beberapa kali reaksi digesti, DNA ikut terdegradasi atau

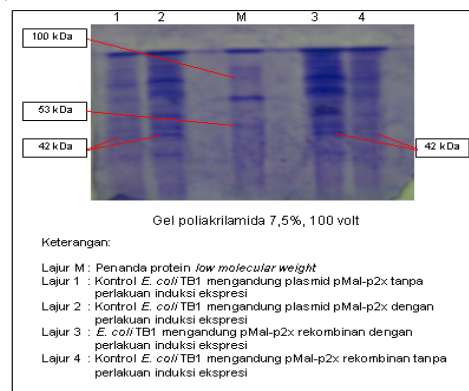
smear RNA tetap tidak dapat diatasi. Degradasi DNA antara lain disebabkan oleh kurang sempurnanya pemanasan RNase sebelum penggunaan sehingga masih terdapat DNase di dalam enzim tersebut (Sambrook & Russell, 2001). *Smear* RNA yang tidak dapat diatasi mungkin disebabkan enzim RNase yang digunakan telah mengalami kerusakan akibat ketidakstabilan temperatur penyimpanan. Terbatasnya sampel menyebabkan pengujian ulang digesti *EcoRI* terhadap plasmid tersebut di atas dihentikan. Berdasarkan hasil yang diperoleh, diduga bahwa *insert* cDNA T29 telah berhasil diligasi dengan plasmid pMal-p2x.

Plasmid pMal-p2x yang diduga rekombinan diekspresikan dengan induksi IPTG untuk mengkonfirmasi hasil tersebut lebih lanjut. Ekspresi protein asing yang berlangsung terus-menerus dapat mengakibatkan kematian sel inang. Oleh karena itu, operon *lac* mengontrol plasmid pMal-p2x sehingga ekspresi proteinnya hanya terjadi pada saat tersedia senyawa induser berupa laktosa atau analognya, seperti IPTG. Penggunaan IPTG memberikan keuntungan dibandingkan laktosa, karena IPTG tidak dapat dimanfaatkan dalam metabolisme sel inang sehingga konsentrasinya tidak mengalami perubahan selama percobaan berlangsung. IPTG tersebut akan berikatan dengan represor yang dihasilkan oleh gen *lacI* pada plasmid, sehingga represor tidak lagi menghalangi pengikatan RNA polimerase pada promotor (Fairbanks & Andersen, 1999; Retnoningrum, 2004).

Sebagai tempat penempelan RNA polimerase yang akan menginisiasi berlangsungnya transkripsi, promotor merupakan komponen yang sangat penting dalam sistem ekspresi protein. Promotor mempengaruhi tingkat sintesis mRNA sehingga menentukan jumlah protein yang terekspresi (Brown, 1995). Plasmid pMal-p2x memiliki promotor *tac*, yaitu suatu promotor hibrid yang dikonstruksi dari promotor *lac* dan *trp*. Dengan demikian, promotor *tac* mampu menghasilkan level ekspresi protein yang jauh lebih tinggi dibandingkan kedua promotor asalnya, serta memiliki sifat regulasi sebagaimana promotor *lac* (Glick & Pasternak, 1998).

Protein *insert* akan diekspresikan dalam bentuk protein fusi dengan *maltose binding protein* (MBP), sehingga mencegah degradasi dan mempermudah purifikasi protein *insert* tersebut (Glick & Pasternak, 1998). MBP dikode oleh gen *malE* yang diisolasi dari *E. coli*. Protein fusi yang dihasilkan oleh plasmid pMal-p2x rekombinan akan disekresikan ke ruang periplasmik. Sekresi periplasmik mempermudah pemisahan protein fusi dengan protein-protein kontaminan di dalam sel melalui metode pemisahan fisik, seperti teknik sentrifus (Simmons & Yansura, 1996).

Protein kasar divisualisasikan melalui SDS-PAGE dengan konsentrasi gel pemisah sebesar 7,5%. Gel dengan konsentrasi tersebut mampu memisahkan pita protein berukuran 36 hingga 94 kDa (Bollag *et al.*, 1996). Kisaran tersebut sesuai untuk mengukur keberadaan protein MBP yang berukuran sekitar 42 kDa (New England Biolabs, 2003), maupun protein fusi yang diperkirakan akan berukuran sekitar 100 kDa. *Insert* cDNA T29 yang berukuran sekitar 1,8 kb diperkirakan akan mengekspresikan protein sebesar 60 kDa (Robinson, 2004). Berdasarkan uji ekspresi tersebut tidak diperoleh adanya perbedaan pita protein bakteri rekombinan dengan bakteri kontrol, yaitu bakteri yang membawa plasmid tanpa *insert* (Gambar 6).



Gambar 6. Hasil SDS PAGE induksi ekspresi plasmid pMal-p2x rekombinan

Hasil PCR dan ekspresi protein dari plasmid yang diduga bersifat rekombinan menunjukkan bahwa belum diperolehnya plasmid pMal-p2x yang telah tersisipkan dengan *insert* cDNA T29. Hasil positif pada reaksi digesti plasmid tersebut menggunakan enzim restriksi *PstI* diduga disebabkan oleh ketidaksempurnaan restriksi plasmid sehingga konformasi plasmid tidak linier seluruhnya. Akibatnya, plasmid sampel tersebut nampak berukuran lebih besar jika dibandingkan dengan plasmid kontrol yang linier seluruhnya. Menurut Moeis & Rahman (2004), perbedaan konformasi DNA akan mempengaruhi kecepatan pergerakannya dalam medium gel.

Kegagalan diperolehnya plasmid pMal-p2x yang mengandung *insert* cDNA T29 dapat disebabkan oleh kelemahan penapisan. Sebagaimana dikemukakan di atas, tidak dilakukan seleksi a-komplementasi terhadap koloni pMal-p2x rekombinan. Hal tersebut mempersulit proses seleksi karena pengujian digesti harus dilakukan terhadap isolat plasmid dari semua koloni yang terbentuk. Keterbatasan waktu menyebabkan isolasi dan pengujian plasmid rekombinan tidak dilakukan terhadap semua koloni.

Kemungkinan lainnya adalah tidak terjadinya ligasi antara plasmid dengan *insert*. Hal tersebut mungkin terjadi karena rasio *insert*: vektor yang digunakan tergolong rendah. Suatu reaksi ligasi harus memiliki konsentrasi molar DNA yang cukup tinggi untuk terjadinya rekombinasi vektor dan *insert*. Akan tetapi, konsentrasi tersebut juga tidak boleh terlalu tinggi untuk mencegah ligasi antar molekul yang sama (vektor dengan vektor, dan *insert* dengan *insert*) dapat dikurangi (Struhl 1994). Dengan demikian, tidak terjadinya ligasi antara pMal-p2x dengan *insert* cDNA T29 mungkin disebabkan oleh konsentrasi molar *insert* yang kurang memadai.

KESIMPULAN

Berdasarkan uji ekspresi cDNA T29 dengan menggunakan SDS PAGE menunjukkan tidak adanya perbedaan pita protein bakteri rekombinan dengan bakteri kontrol, yaitu bakteri yang membawa plasmid tanpa *insert*. Dengan demikian dapat disimpulkan bahwa cDNA T29 tidak membawa gen pengkode protein *Toxoplasma gondii*.

Dari hasil penelitian ini disarankan agar melakukan verifikasi pada cDNA lain dari ke 7 cDNA yang telah didapat untuk memastikan agar cDNA pembawa gen pengkode protein dari *Toxoplasma gondii* telah didapat.

KEPUSTAKAAN

- Aubert D, Maine G.T, Villena L, Hunt JC, Howard L, Sheu M, Brojanac S, Chovan LE, Nowlan SF, & Pinon JM, 2000. Recombinant antigens to detect *Toxoplasma gondii*-specific immunoglobulin G and immunoglobulin M in human sera by enzyme immunoassay. *J. Clin. Microbiol.* 38(3): 1144–1150.
- Bloch KD & Grossmann B, 1994. Restriction endonucleases. *Dalam*: Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA, & K. Struhl (eds.). 1994. *Current protocols in molecular biology*. John Wiley & Sons, Inc., New York: 3.1.1–3.1.9.
- Bogosian G, Kane JF, Obukowicz MG, & Olins PO. 1991. Optimizing Protein Production In Recombinant Strain of *E.coli*. *Dalam*: *Recombinant DNA Technology and Application*. 1991. McGraw-Hill, Inc., New York: 285–315.
- Brown TA, 1995. *Gene cloning: An introduction*. 3rd ed. Chapman & Hall: xiv + 334 hlm.
- Fairbanks DJ & Andersen WR. 1999. *Genetics: The continuity of life*. Brooks/Cole Publishing Company, Pacific Grove: xix + 818 hlm.
- Gandahusada S, 1998. *Toxoplasma gondii*. *Dalam*: Sriasi G, Ilahuede HHD, & Pribadi W (eds.). 1998. *Parasitologi kedokteran*. FKUI, Jakarta: 153–161.
- Giddings G, Allison G, Brooks D & Carter A, 2000. Transgenic plants as factories for biopharmaceuticals. *Nature Genet.* 18: 1151–1155.
- Glick, B.R & J.J. Pasternak. 1998. *Molecular biotechnology: Principles and applications of recombinant DNA*. 2nd ed. ASM Press, Washington: xxiii + 683 hlm.
- Goeddel DV, 1990. Expression of heterologous protein in *E. coli*. *Methods Enzymol.* 185: 3–7.
- Griffiths AJF, Miller JH, Suzuki DT, Lewontin RC, and Gelbart WM. 2000. *An introduction to genetic analysis*. W.H. Freeman, New York: xvii + 860 hlm.
- Li S, Maine G, Suzuki Y, Araujo FG, Galvan G, Remington JS, and Parmley S, 2000. Serodiagnosis of recently acquired *Toxoplasma gondii* infection with a recombinant antigen. *J. Clin. Microbiol.* 38(1):179–184.
- Lodish H, Berk A, Zipursky SL, Matsudaira P, Baltimore D and Darnell J, 2000. *Molecular cell biology*. 4th ed. Freeman WH & Company, Basingstoke: xxxix + 1084 + G–17 + I–36.
- Moeis MR & Rahman EAG, 2004. Kloning, pustaka DNA & PCR. *Dalam*: KPP Bioteknologi ITB. 2004. *Bioteknologi molekul: Dari gen ke protein*. KPP Bioteknologi ITB, Bandung: 9–15.
- New England Biolabs, 2003. *pMal™ protein fusion and purification system*. New England Biolabs, Inc., Beverly: 52 hlm.
- Paoletta P, 1998. *Introduction to molecular biology*. WCB McGraw-Hill, Boston: xi + 241 hlm.
- Retnoningrum DS, 2004. Regulasi ekspresi gen pada bakteri. *Dalam*: KPP Bioteknologi ITB. 2004. *Bioteknologi molekul: Dari gen ke protein*. KPP Bioteknologi ITB, Bandung: 16–24.
- Robinson CR, 2004. Protein structure and function. 26 hlm. http://www.udel.edu/chem/robinson/courses_doc/527_S04/Lecture2.pdf+kDa%3D+amino+acid&hl=id. 14 Desember 2004, pk. 16.09
- Sambrook J and Russell DW. 2001. *Molecular cloning: A laboratory manual*. 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York: xxvii + 18.136 + A.14.1 + R.22 + I. 44.
- Simmons, L.C. & D.G. Yansura. 1996. Translation level is a critical factor for the secretion of heterologous proteins in *Escherichia coli*. *Nat. Biotechnol.* 14: 629–634.
- Struhl K, 1994. Construction of hybrid DNA molecules. *Dalam*: Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA, and Struhl K, (eds.). 1994. *Current protocols in molecular biology*. John Wiley & Sons, Inc., New York: 3.16.1–3.16.6.
- Towner P, 1991. Purification of DNA. *Dalam*: Brown TA (ed.). 1991. *Essential molecular biology: A practical approach*. Oxford University Press, Oxford: 47–68.
- Weatherly NF 1992. Medical parasitology. *Dalam*: Joklik WK, Willet HP, Amos DB, and Wilfert CM, (eds.). 1992. *Zinsser microbiology*. 20th ed. Appleton & Lange, Norwalk: 1163–1185.
- Vercamen M, Scorza T, Huygen K, De Braekeleer J, Diet R, Jacobs D, Saman E, and Verschuere H. 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.