

Ligasi dan Transformasi Gen *MSP1 Plasmodium falciparum* Penyebab Malaria di Kota Jayapura

Arsyam Mawardi, Euniche R. P. F. Ramandey

Departemen Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Universitas Cenderawasih

Abstrak

MSP1 merupakan protein yang antigenik dan paling banyak diekspresikan pada permukaan merozoit ketika menginfeksi eritrosit pasien malaria sehingga banyak dikembangkan untuk desain terapi vaksin. Proses ligasi dan transformasi gen *MSP1* merupakan upaya penggandaan gen untuk menghasilkan produk yang sama ketika diekspresikan. Penelitian ini bertujuan mengkloning gen *MSP1 P. falciparum* dari pasien malaria tropika di Jayapura menggunakan vektor pJET1.2/*blunt* dan sel kompeten *E. coli* DH5 sehingga didapatkan perbanyakan plasmid rekombinan yang mengandung gen *MSP1*. Darah yang positif mengandung *P. falciparum* diproses secara molekuler; diawali tahapan isolasi DNA genom, amplifikasi dengan teknik PCR, ligasi ke dalam vektor pJET1.2/*blunt* dan ditransformasi pada *E. coli* DH5 α dengan metode *Heat Shock Transformation*, diakhiri dengan konfirmasi PCR untuk memastikan tersisipkannya gen blok 2 *MSP1*. Hasil penelitian menunjukkan bahwa konfirmasi keberadaan gen *MSP1* dalam pJET1.2/*blunt* dengan PCR berhasil dilakukan. Dari total 10 koloni positif yang ditumbuhkan dalam kultur cair, kemudian diisolasi plasmid dan dikonfirmasi dengan PCR diperoleh pita hasil elektroferogram dengan ukuran sekitar 1049 bp yang menunjukkan gen *MSP1* dalam plasmid. Berdasar atas hasil tersebut, kloning gen *MSP1* menggunakan vektor kloning pJET1.2/*blunt* dan sel kompeten *E. coli* DH5a telah berhasil dilakukan. [MKB. 2017;49(4):213-23]

Kata kunci: *Heat Shock*, ligasi, *MSP1*, *P. falciparum*, transformasi

Malaria-causing *MSP-1 Plasmodium falciparum* Ligation and Transformation in Jayapura City

Abstract

MSP1 is the most antigenic and expressed protein on merozoite surface when it infects the erythrocytes of malaria patients which leads to its use for vaccine therapy design development. The ligation and transformation process of the MSP1 gene is a gene duplication attempt for producing the same product during expression. This study aimed to clone *P. falciparum* MSP-1 gene from tropical malaria patients in Jayapura using pJET1.2/*blunt* vectors and *E. coli* DH5 α competent cells, to get the recombinant plasmid propagation of MSP1 gene. Blood that was positive for *P. falciparum* was molecularly processed, starting with genomic DNA isolation and then followed by PCR amplification, ligation into pJET1.2/*blunt* vector, and transformation into *E. coli* DH5 α using the heat shock transformation method. The process was ended with PCR confirmation to confirm MSP1 gene insertion. The results showed that the presence of the MSP1 gene in pJET1.2/*blunt* was successfully confirmed through PCR. From a total of 10 positive colonies grown in liquid culture, plasmid was isolated. Electropherogram result presented bands of about 1049bp, indicating the presence of the MSP1 gene in plasmid. Hence, MSP1 gene cloning using pJET1.2/*blunt* cloning vector and competent cell *E. coli* DH5 α has been successfully performed. [MKB. 2017;49(4):213-23]

Key words: Heat shock, ligation, MSP-1, *P. falciparum*, transformation

Korespondensi: Arsyam Mawardi, S.Si, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Cenderawasih Jayapura, Jalan Kampwolker, Kampus Baru Uncen. Waena. Jayapura, *E-mail:* mawardiarsyam@unicen.ac.id, mawardiarsyam@gmail.com

Pendahuluan

Di negara tropis seperti Indonesia, penyakit malaria tropika yang disebabkan *Plasmodium falciparum* menjadi problem serius.¹ Penyakit ini merebah akibat dari patogenitas dan sifat antigenik *merozoite surface protein-1* (MSP1) yang diekspresikan pada permukaan merozoit dari *Plasmodium falciparum* yang menginfeksi eritrosit manusia. Protein tersebut memiliki kemampuan untuk dapat menginduksi respons anti bodi. Proses amplifikasi, insersi, serta transformasi gen MSP1 dari Jayapura sejauh ini terbilang masih kurang diteliti. Oleh karena itu, menjadi sangat penting dilakukan, mengingat upaya meneliti dan juga menghasilkan vaksin pencegahan malaria sedang marak dilakukan. Vaksin tersebut didesain dengan menjadikan protein permukaan sebagai analisis awal dalam diagnosis molekuler. MSP1 merupakan protein yang paling banyak diekspresikan pada permukaan merozoit ketika menginfeksi eritrosit pasien malaria. Dengan demikian, gen MSP1 yang telah didapatkan perlu untuk dilakukan perbanyakkan, salah satunya melalui proses insersi ke dalam vektor kloning untuk menghasilkan plasmid rekombinan dan transformasi ke dalam *E. coli*.²

Kloning gen dewasa ini menjadi sebuah langkah untuk mendapatkan gen yang mungkin sangat dibutuhkan bagi kehidupan manusia. Kloning merupakan teknik penggandaan gen yang menghasilkan turunan yang sama sifat baik dari segi hereditas maupun penampakkannya dengan induknya ketika gen itu diekspresikan menjadi sebuah protein fungsional.³ Kloning gen pada intinya mencakup 2 hal, yaitu proses ligasi dan transformasi. Kebanyakan gen-gen telah ditetapkan sebagai lokus plastid standar yang digunakan dalam penyusunan barcode DNA oleh *the Consortium for the Barcode of Life* (CBOL).⁴

Gen-gen penyandi protein penyebab malaria juga merupakan gen penyakit yang sudah menginfeksi manusia hampir merata di seluruh dunia terutama di negara-negara beriklim tropis seperti Asia, Afrika, serta Amerika Tengah dan Selatan.⁵ Lebih jauh, sulitnya penanganan malaria disebabkan oleh secara genetik ia dapat bermutasi menghadapi berbagai membentuk *strain* baru lebih resisten terhadap obat malaria. Terbentuknya variasi genetik yang juga berbeda seperti perbedaan respons terhadap lingkungan.⁶

Gen-gen *P. falciparum* yang beragam dan juga diekspresikan sebagai protein-protein permukaan merozoit (MSP) terkhusus MSP1 adalah suatu bentuk variasi genetik yang terjadi dalam suatu populasi. Hal ini disebabkan oleh

beberapa hal, di antaranya peristiwa mutasi dan rekombinasi.⁷ Sementara itu, polimorfisme yang terdapat pada sejumlah gen seperti MSP1 yang mensintesis protein antigen tersebut dapat dipakai sebagai marker genetik untuk dapat menentukan perbedaan genetik dari *P. falciparum*.⁸ Kemajuan pesat di bidang rekayasa genetika dan juga bioteknologi molekuler telah memudahkan identifikasi molekuler melalui proses ligasi dan transformasi gen.

Penelitian ini akan sangat bermanfaat untuk mengetahui efektivitas pJET1.2/*blunt* sebagai vektor kloning dan sel kompeten *E. coli* DH5a sebagai bakteri yang mampu menyimpan dan juga memperbanyak gen pengkode protein permukaan merozoit, sebagai penanda genetik penyebab malaria tropika di daerah Jayapura. Harapan yang begitu besar jika proses ligasi dan transformasi gen dapat dilakukan secara tepat maka akan menyediakan stok gen blok 2 pengkode MSP1. Hasil ini diharapkan dapat menjadi langkah dasar untuk membuat desain vaksin maupun menentukan terapi yang mampu mencegah prevalensi penyakit malaria tropika yang dinilai amat penting dalam upaya penanganan serta pencegahan malaria, khususnya *Plasmodium falciparum* isolat lokal kota Jayapura

Metode

Metode penelitian yang dipergunakan adalah metode deskriptif laboratoris untuk menginsersi gen blok 2 MSP1 dari *Plasmodium falciparum* ke dalam plasmid lalu mentransfer ke dalam *E. coli* DH5a. Penelitian ini merupakan penelitian molekuler dasar dari judul besar *Genotyping Plasmodium falciparum* (MSP1) dengan teknik PCR isolat daerah endemik kota Jayapura sebelum dilakukan analisis *insilico* berupa pengolahan *database* dengan *software* berbasis bioinformatik.

Pengumpulan sampel darah pasien yang telah positif mengandung *Plasmodium falciparum* melalui pemeriksaan mikrobiologis di RSUD kota Jayapura, selanjutnya akan diidentifikasi, diisolasi DNA-nya, diamplifikasi, diligasi, dan ditransformasi ke dalam sel kompeten yang dilakukan di Laboratorium Analisis molekuler SITH Institut Teknologi Bandung serta di Laboratorium Biokimia PAU ITB.

Tahapan yang dilakukan dalam penelitian ini antara lain: darah yang dipilih untuk dijadikan sebagai bahan analisis molekuler adalah yang memiliki parasit *Plasmodium falciparum* melalui

pemeriksaan mikrobiologi yang diperiksa di bawah mikroskop oleh dua orang analis obeserver. Isolasi DNA dengan menggunakan *Qucik DNA Universal KIT Zymo Research USA*. Proses PCR dengan volume reaksi 20 mikroliter menggunakan sepasang primer spesifik PfMSP1_F dan PfMSP1_R

Stok gliserol *E. coli* DH5 α diinokulasi pada 5 mL medium LB cair dalam tabung *falcon* 15 mL steril dan diinkubasi pada *shaker* inkubator suhu 37°C selama 12 jam. Lalu sebanyak 1 mL diinokulasi ke 50 mL medium LB dan diinkubasi pada *shaker* inkubator 37°C hingga OD-nya mencapai 0,3–0,4. Sebanyak 12,5 mL *E. coli* DH5 α dengan OD 0,3–0,4 dialiokot ke dalam tabung *falcon* 15 mL steril. Lalu tabung disentrifuga pada kecepatan 3.000 g dengan suhu 4°C selama 10 menit, supernatan dibuang. Pelet ditambah dengan 4 mL bufer CCMB80 dingin (diresuspensi dengan 2 mL terlebih dahulu, lalu ditambahkan sisanya). Larutan diinkubasi di dalam es selama 20 menit. Disentrifugasi pada kecepatan 3.000 g dengan suhu 4°C selama 10 menit, supernatan dibuang. Pelet dire suspensi dengan 0,6 mL bufer CCMB80 dingin. Selanjutnya, larutan diinkubasi di dalam es selama 20 menit. Larutan dialiokot ke dalam *microtube* 1,5 mL @100 μ L. Sel kompeten disimpan pada *freezer* suhu -80°C. Setelah diinkubasi selama 30 menit dalam es sel kompeten siap untuk tahap transformasi.

Gen *MSP1* dan alel hasil PCR diligasi dengan tahapan: pembuatan *blunting reaction* di atas es yang terdiri atas 10 μ L 2X *reaction buffer*, 1 μ L 0,15 pmol *ends DNA template*, Air bebas nuklease hingga 17 μ L, enzim DNA *blunting* 1 μ L. Larutan di-*vortex* sampai homogen dan disentrifuga selama 3–5 detik. Selanjutnya larutan diinkubasi pada suhu 70°C selama 5 menit, lalu didinginkan di es. Pembuatan *ligation reaction* di atas es yang terdiri atas 1 μ L (0,05 pmol) pJET1.2/*blunt cloning* vektor (50 ng/ μ L), 1 μ L T4 DNA ligasi. Larutan di-*vortex* dan disentrifuga selama 3–5 detik. Campuran ligasi diinkubasi pada suhu ruang (22°C) selama 5 menit. Campuran ligasi harus segera digunakan.

Sel kompeten *E. coli* DH5 α diambil dari tempat penyimpanan suhu -80°C. Sel kompeten dicairkan dan diinkubasi di dalam es selama 10 menit. Selanjutnya plasmid pJET1.2/*blunt* rekombinan hasil kloning dimasukkan ke dalam tabung *microfuge* sebanyak 10 μ L yang telah berisi 100 μ L sel kompeten. Tabung dijentik beberapa kali, kemudian diinkubasi di dalam es selama 30 menit. Tabung diberi kejut panas dengan cara diinkubasi dalam *water bath* suhu 42°C selama 90 detik, kemudian diinkubasi

kembali di dalam es selama 10 menit. Sebanyak 600 μ L SOC ditambahkan ke dalam tabung kemudian diinkubasi dan dikocok pada suhu 37°C selama 2–3 jam dengan kecepatan *shaker* 250 rpm. Sebanyak 100 μ L kultur *E. coli* DH5 α hasil transformasi dituang dan disebarakan secara merata diatas permukaan medium LB padat yang mengandung 100 μ g/mL antibiotik ampicilin pada cawan petri menggunakan batang L. Cawan petri diinkubasi pada suhu 37°C selama 16–18 jam, lalu diamati.

RNAse A *solution* tersebut terlebih dahulu ditambahkan ke dalam *resuspension solution*, lalu di-*mix* hingga larut, lalu disimpan di kulkas 4°C. Etanol 96% ditambahkan ke *wash solution* sebelum pertama kali dipergunakan. Presipitat-presipitat garam yang ada di-*lysis solution* dan *neutralization solution* itu dilarutkan kembali dengan cara memanaskannya di suhu 37°C, lalu didinginkan kembali di suhu ruang (suhu 25°C) sebelum digunakan

Berikutnya, 1,5 mL LB cair hasil kultur cair dimasukkan ke dalam *microtube* 1,5 mL, lalu disentrifugasi pada kecepatan 14.000 rpm selama 1 menit, kemudian supernatan dibuang. Pelet yang ada ditambahkan lagi dengan 1,5 mL LB cair hasil kultur cair. Disentrifugasi kembali pada kecepatan 14.000 rpm selama 1 menit dan supernatan dibuang. Langkah ini terus dilakukan sampai semua kultur cair habis. Pelet terakhir yang didapatkan kemudian ditambahkan 250 μ L *resuspension solution* yang sebelumnya telah ditambahkan RNAse A. Lalu, divorteks hingga semua pelet larut. Selanjutnya, ditambahkan 250 μ L *lysis solution* dan dibolak-balik sebanyak 4–6 kali secara perlahan, sampai *solution* menjadi kental dan terlihat jernih. Dilanjutkan dengan menambahkan 350 μ L *neutralization solution* dan dibolak-balik secara cepat selama 4–6 kali. Kemudian disentrifugasi 14.000 rpm selama 5 menit. Presipitat putih jangan sampai ikut terambil. Lalu, disentrifugasi 14.000 rpm selama 1 menit. Cairan tersisa yang terdapat pada *collection tube* dibuang dan *GeneJET spin column* ditempatkan kembali. Ditambahkan 500 μ L *wash solution* yang sebelumnya telah ditambahkan etanol, lalu disentrifugasi 14.000 rpm selama 1 menit. Cairan yang tersisa dibuang. *GeneJET spin column* kembali ditempatkan pada *collection tube*. Lalu disentrifugasi selama 1 menit 14.000 rpm untuk menghilangkan residu dari *wash solution* sebelumnya. *GeneJET spin column* ditempatkan pada mikrotub 1,5 mL baru. Kemudian ditambahkan *elution buffer* 25 μ L dan dibiarkan selama 2 menit agar terserap semua pada matriks kolom. Kemudian disentrifugasi

Tabel 1 Jumlah Parasit dalam Sediaan Darah

Metode Analisis	Plasmodium			Parasite	
	<i>vivax</i>	<i>falciparum</i>	<i>malariae</i>	<1.000	>1.000
Dengan transmisi (+)	9 (20%)	35 (78%)	1(2%)	1 (3%)	34 (97%)
Tanpa transmisi (-)	-	-	-	-	-
Total	9 (20%)	35 (78 %)	1 (2%)	1 (3%)	34 (97%)

14.000 rpm selama 2 menit. Lalu ditambahkan lagi 25 µL *elution buffer*, dibiarkan selama 2 menit dan disentrifugasi selama 2 menit 14.000 rpm. Selanjutnya hasil isolasi plasmid langsung dielektroferogram.

DNA hasil isolasi, PCR, ligasi, dan transformasi dilihat dengan menggunakan elektroferogram gel agarosa 2%, TAE 1X, dan *nanopure water* pada elektroferogram horizontal. DNA akan memunculkan pendaran warna akibat reaksi dari penambahan larutan *ethidium bromide*. Dari hasil itu akan terlihat *band* atau profil pita yang menunjukkan ukuran basa nukleotida dari gen tersebut setelah dilakukan penjejajaran dengan DNA *ladder* sebagai *marker*.

Hasil elektroferogram dari amplifikasi, ligasi, dan transformasi gen *MSP1* blok 2 dianalisis dengan melihat ukuran basa nukleotida. Ukuran basa nukleotida akan memperlihatkan *size* gen *MSP1*. Data disajikan secara naratif deskriptif dan dalam bentuk gambar.

Hasil

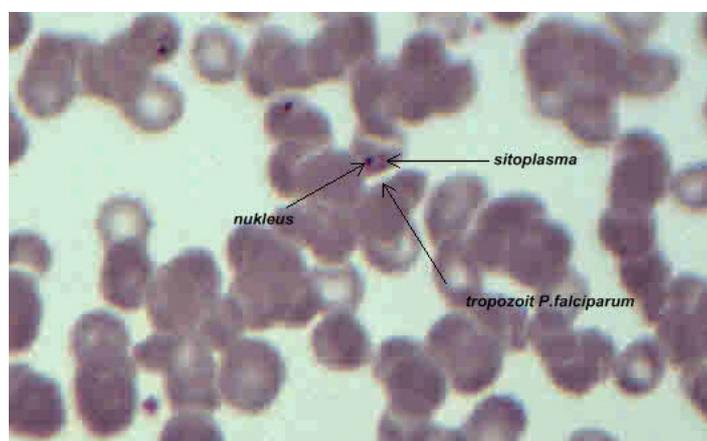
Pemeriksaan *Plasmodium* terhadap 45 sediaan darah dengan metode apusan darah giemsa dijumpai sediaan darah dengan hasil positif *Plasmodium falciparum* paling dominan. Setelah

dilakukan perbandingan di laboratorium, jumlah sediaan darah yang positif mengandung parasit malaria adalah *P. falciparum* (n=35), *P. vivax* (n=9), dan *P. malariae* (n=1). Tidak ditemukan jenis *P. ovale* dan selama ini *P. ovale* memang jarang ditemukan karena *ovale* memiliki masa inkubasi intrinsik yang jauh lebih lama. Data lengkap mengenai hasil pemeriksaan metode apusan darah giemsa dapat dilihat pada Tabel.

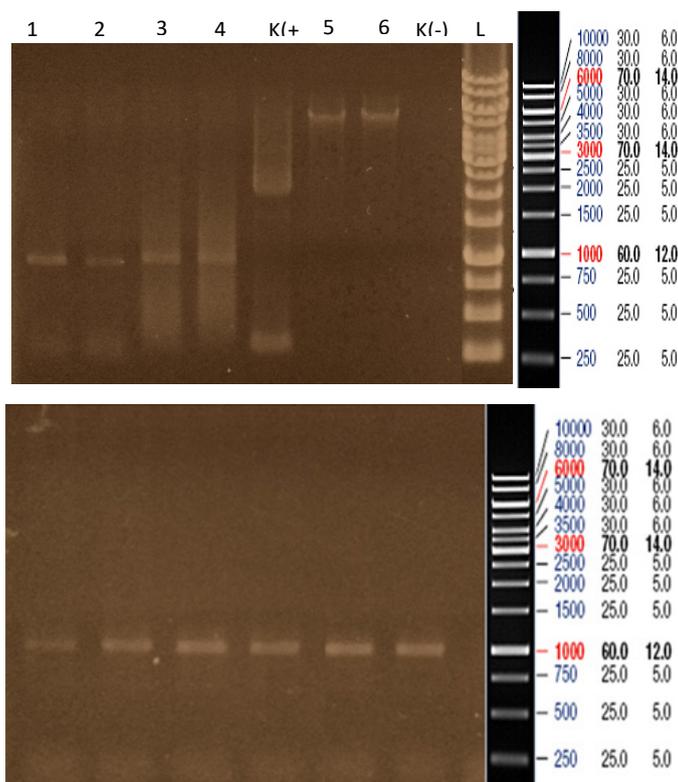
Berdasar atas hasil pemeriksaan sediaan darah tipis, diperoleh 35 sediaan yang positif *Plasmodium falciparum*. Pada gambar tampak inti parasit berwarna merah dengan sitoplasma yang berwarna biru keunguan dan tampak pigmen ungu kehitaman, dan ditemukan juga bentuk *double* kromatin.

Tahapan yang diawali dengan pemeriksaan mikroskopis diperoleh sediaan positif malaria dengan *parasite count* (>1000) sebanyak 34 sediaan, namun yang dianalisis adalah 30 sediaan berdasar atas hitungan statistika dianggap telah memenuhi standar berdasarkan statistik dengan *drop out* 10–20%.

Darah ini diisolasi DNA genomnya untuk analisis lanjutan. Produk isolasi DNA genom dari plasmodium dielektroferogram untuk mengetahui ada tidaknya DNA. Dari sampel yang tersedia, tidak semua sampel dapat terisolasi



Gambar 1 Hasil Positif *P. falciparum* pada Sediaan Apusan Darah Tipis



Gambar 2 Elektroferogram Amplifikasi Gen MSP1

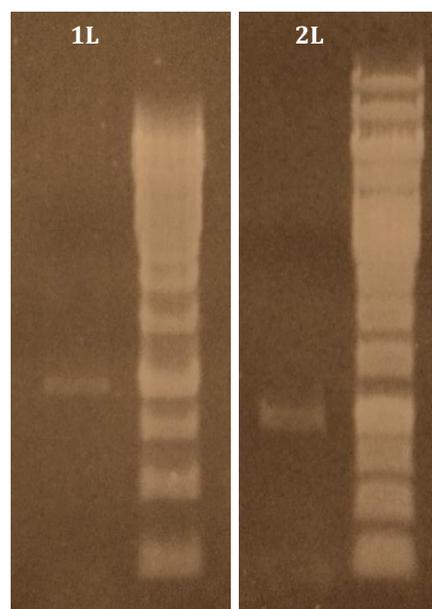
Keterangan: L: DNA ladder 1 kb, 1-10: hasil PCR gen *MSP1*, K(+): kontrol positif, K1- : kontrol negatif

DNA genomnya disebabkan oleh rentang waktu optimasi KIT dalam proses isolasi DNA genom. Hasil isolasi DNA genom yang telah diperoleh selanjutnya diamplifikasi menggunakan primer spesifik *PfMSP1_F* dan juga *PfMSP1_R* untuk mendeteksi gen *MSP-1* dari setiap sampel.

Proses amplifikasi gen *MSP1 P. falciparum* menggunakan metode PCR dengan temperatur *annealing* 56°C dengan jumlah 30 siklus. Proses amplifikasi gen *MSP1* telah berhasil dilakukan pada 10 sampel DNA genom. Amplifikasi gen *MSP1* dengan menggunakan sepasang primer menghasilkan pola pita (Gambar 3).

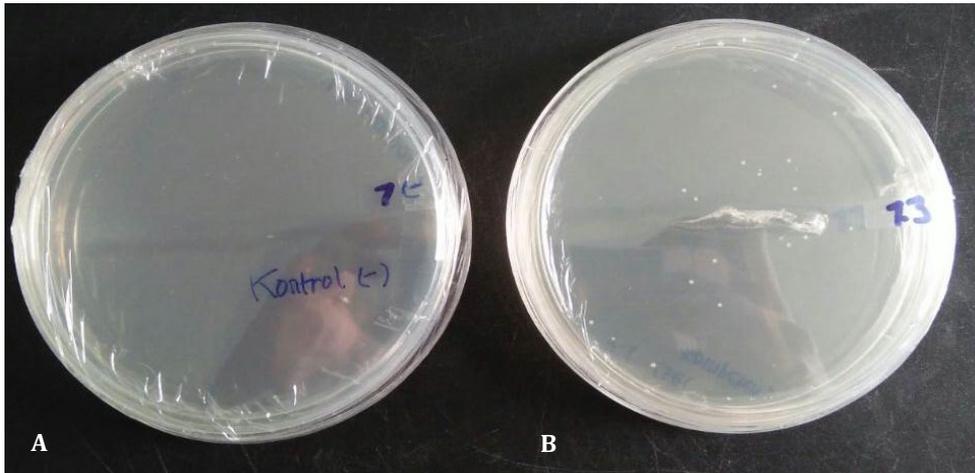
Pada tahapan ini gen *MSP1* tersebut dapat diamplifikasi, terbukti dengan profil pola pita setelah dielektroforesis dengan ukuran 1.049 bp. Amplifikasi gen pengode *MSP1* menggunakan PCR dilakukan sebanyak 30 siklus dengan volume reaksi kombinasi 20 mL dan 50 mL. Amplifikasi gen target berhasil dilakukan terhadap 10 sampel genomik DNA pasien, yaitu kode 1-10.

Sebagai persiapan sebelum melakukan kloning ke dalam plasmid pJET 1.2/*blunt*. Produk PCR dipurifikasi dengan menggunakan PCR *fragment extraction kit* untuk menghilangkan



Gambar 3 Elektroferogram Hasil Purifikasi Produk PCR

Keterangan: L : DNA ladder 1 kb, 1-2: hasil purifikasi (1.049 bp)



Gambar 4 Koloni Sel Kompeten *E. coli* DH5 α Hasil Transformasi

Keterangan: A: media kontrol negatif tidak ada koloni; B: media yang diinokulasikan sampel, terdapat 17 koloni

segala kontaminan dan inhibitor

Bakteri yang mampu mengambil DNA disebut sel kompeten dan kompetensi sel dapat diinduksi dengan penambahan kalsium klorida pada fase log awal pertumbuhan. Jenis sel kompeten yang dipakai adalah *Escherichia coli* DH5 α .

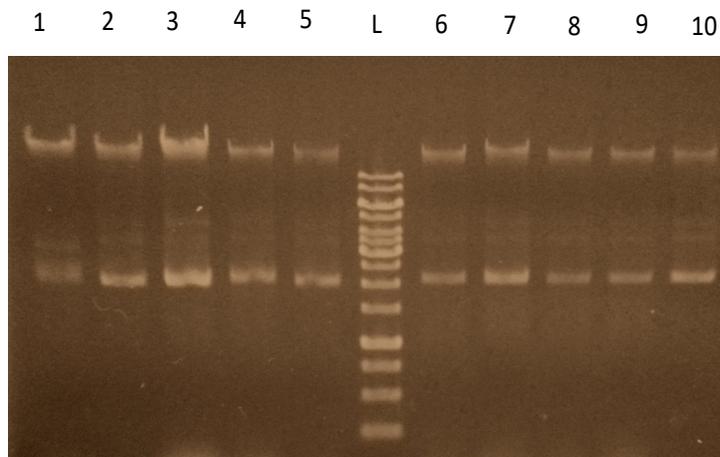
Kloning gen *MSP1* dilakukan menggunakan vektor kloning pJET1.2/*blunt*. Plasmid ini mempunyai ukuran 2.974 bp, *blunt end*, sistem seleksi memakai ampisilin dan sistem reporter gen menggunakan gen *lethal* (*eco471R*).

Keberhasilan dari transformasi diuji seleksi dengan cara menumbuhkan kultur *E. coli* hasil transformasi pada medium yang mengandung

ampisilin. Dengan ampisilin maka sel *E. coli* yang dapat tumbuh hanya sel yang mengandung plasmid pJET1.2/*blunt* karena plasmid ini mempunyai ampisilin resisten.

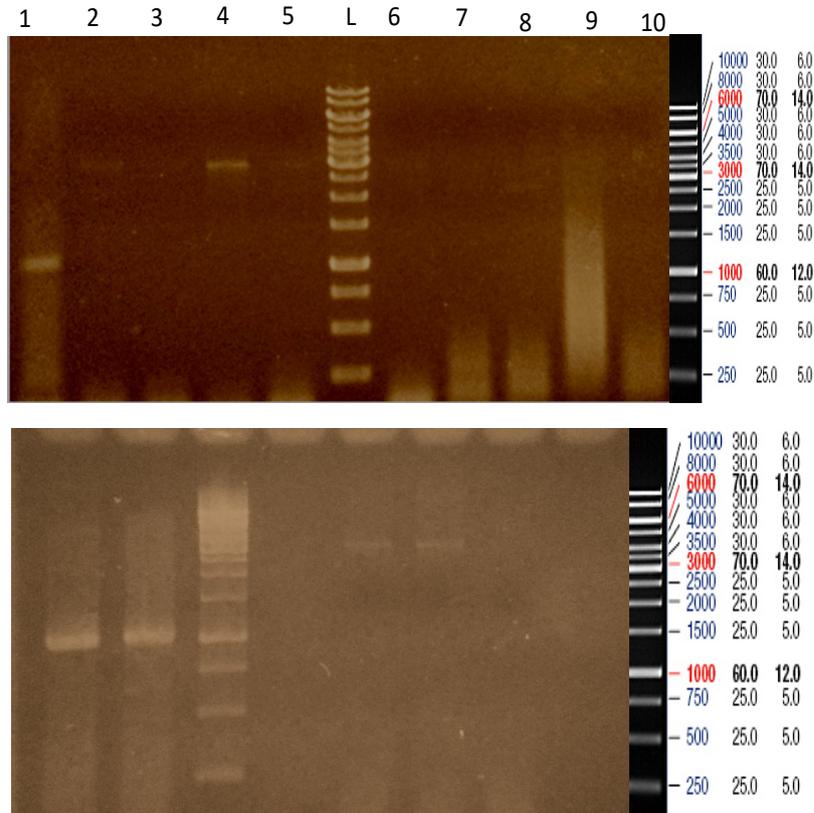
Beberapa koloni positif *E. coli* DH5 α yang telah dikultur dalam LB cair lalu diisolasi dengan metode alkali lisis, dihasilkan plasmid terlihat pada Gambar 5.

Plasmid yang terlihat profil pola pitanya dianalisis lebih jauh dengan melakukan konfirmasi, guna validasi kebenaran gen *insert MSP1*. Adapun hasil konfirmasi melalui PCR ditunjukkan oleh Gambar 6.



Gambar 5 Elektroferogram Plasmid Transforman

Keterangan: L : DNA ladder 1 kb, 1-10: plasmid



Gambar 6 Elektroferogram Konfirmasi Plasmid dengan PCR

Keterangan: L : DNA ladder 1 kb, 1-18: plasmid

Pembahasan

Sediaan darah yang berasal dari RSUD Dok 2 Kota Jayapura diperiksa untuk dapat mendeteksi jenis *plasmodium* yang dominan dalam darah. *Plasmodium falciparum* adalah jenis *Plasmodium* yang mendominasi infeksi malaria di RSUD Jayapura, yakni berjumlah 35, sementara *P. vivax* 9 dan *P. malariae* hanya 1. Dari berbagai kajian literatur, *P. falciparum* merupakan jenis parasit malaria paling berbahaya karena penyakit yang ditimbulkan dapat menjadi berat dan bersifat komplikasi. Hal ini dikarenakan kemampuan parasit ini dalam menginvasi seluruh jenis sel darah merah (eritrosit muda, retikulosit, dan normosit).¹⁰ Hal ini sejalan dengan hasil penelitian WHO dalam kurun waktu 5 tahun sejak tahun 2010 yang menemukan bahwa hampir 85% total infeksi malaria di dunia yang disebabkan oleh spesies ini karena dapat menyebabkan komplikasi malaria, seperti malaria serebral bahkan kematian.^{7,9} Penetapan untuk menentukan berat ringannya infeksi malaria pada seorang pasien diukur dengan

parasite count (hitung parasit) yaitu jumlah parasit dalam 1 mm³ darah. Tinggi rendahnya jumlah hitung parasit seorang penderita malaria mengindikasikan tingkat parasitemia yang dialaminya.^{11,12}

Proses amplifikasi gen *MSP1 P. falciparum* menggunakan metode PCR dengan *temperature annealing* 56°C dengan jumlah 30 siklus. Proses amplifikasi gen *MSP1* telah berhasil dilakukan pada 10 sampel DNA genom. Gen *MSP1* dapat diamplifikasi, terbukti dengan profil pola pita setelah dielektroforesis dengan ukuran 1.049 bp. Hal ini dibuktikan dengan sekuens ampikon yang telah dipublikasikan melalui bank data NCBI.

Pembuatan sel kompeten *E. coli* DH5α dengan inkubasi sel selama 12 jam dalam medium LB cair, lama waktu tersebut diperkirakan *E. coli* telah mengalami fase log. Fase log diperlukan agar jumlah bakteri yang terisolasi berada pada kondisi optimal. Penambahan bufer CCMB yang mengandung MgCl₂ yang berfungsi menurunkan kerapatan membran sel melalui interaksi antara Mg²⁺ dan bagian hidrofilik membran.¹³

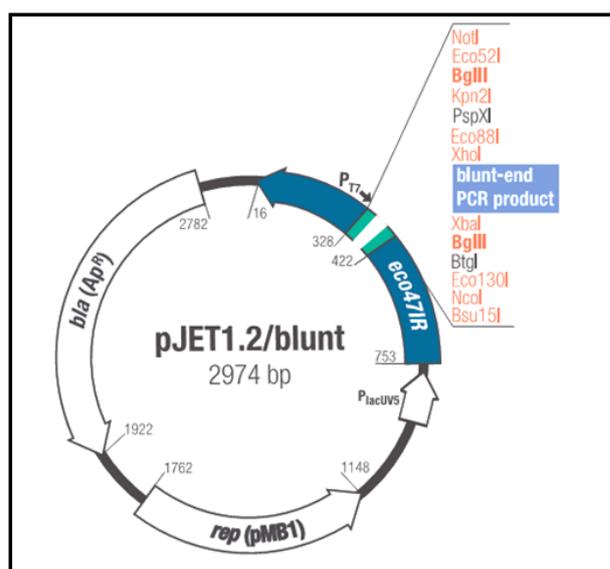
Selain itu juga mengandung CaCl_2 yang dapat memengaruhi bentuk dinding sel, membran bakteri *permeable* pada ion Cl^- . Pada saat ion Cl^- masuk ke dalam membran molekul air menyertai ion Cl^- sehingga menyebabkan sel membengkak dan kondisi ini diperlukan untuk pengambilan DNA.^{13,14} Proses pembuatan dan penyimpanan sel kompeten dilakukan pada suhu dingin, hal ini bertujuan mempertahankan fungsinya sebagai sel kompeten.¹³

Pemilihan *E. coli* DH5 α sebagai bakteri inang karena bakteri tersebut telah mengalami rekayasa genetika sehingga mampu mengenali gen *bla* yang menyandikan enzim beta-laktamase sebagai penanda resistensi terhadap antibiotik ampisilin. Preparasi sel kompeten *E. coli* DH5 α dilakukan dengan menggunakan metode CCMB. Hasil penelitian Cohen dkk. menyatakan bahwa sel *E. coli* yang diperlakukan dengan CCMB merupakan penerima yang efektif bagi DNA plasmid. CCMB akan memengaruhi dinding sel dan mengikatkan DNA ke permukaan sel. Mandel dan Higa (1970) menyatakan bahwa sel *E. coli* yang diperlakukan dengan CCMB akan dapat mengambil DNA dari bakteriofag dan DNA plasmid. Kedua alasan inilah yang mendasari pemilihan *E. coli* DH5 α sebagai sel inang dalam penelitian.

Amplikon hasil PCR yang telah dipurifikasi diligasikan dengan vektor plasmid pJET1.2/*blunt* untuk membentuk plasmid rekombinan dan selanjutnya ditransformasikan ke dalam

bakteri inang *E. coli* DH5 α sedemikian rupa sehingga replikasi dapat terjadi pada DNA rekombinan. Ligasi adalah proses penggabungan dua molekul DNA dengan perantara enzim. *T4 DNA ligase* merupakan enzim yang dipakai dalam proses ligasi karena enzim tersebut dapat mengkatalisis pembentukan ikatan fosfodiester antara gugus 3'-hidroksil pada fragmen DNA gen asing dan gugus 5'-fosfat pada DNA vektor.¹⁴ Pemberian enzim tersebut mampu membentuk kompleks enzim AMP yang selanjutnya terikat pada daerah *nick* (daerah putus). Enzim ligase tersebut dihasilkan oleh bakteri *E. coli* yang telah terinfeksi virus T4.

Kloning gen *MSP1* dilakukan dengan cara memakai vektor kloning pJET1.2/*blunt*. Plasmid ini mempunyai ukuran 2.974 bp, *blunt end*, sistem seleksi menggunakan ampisilin dan sistem reporter gen menggunakan gen *lethal (eco471R)*.¹⁵ DNA hasil PCR mempunyai *overhang* karena DNA polimerase yang digunakan adalah Taq DNA polimerase. Taq DNA polimerase menghasilkan produk dengan ujung *cohesive* atau *sticky end*. Oleh karena itu, supaya DNA hasil PCR tersebut dapat diligasikan ke vektor kloning digunakan enzim *blunting* DNA yang berfungsi untuk memotong ujung DNA hasil PCR menjadi *blunt end*. Ujung DNA dibuat *blunt end* karena vektor kloning pJET1.2/*blunt* memiliki ujung *blunt end*. Selanjutnya DNA hasil PCR diligasikan ke dalam pJET1.2/*blunt* memakai T4 DNA ligase. DNA ligase berfungsi untuk



Gambar 7 Peta Plasmid pJET1.2/*blunt*

mengkatalis pembentukan ikatan fosfodiester fragmen DNA target dengan fragmen plasmid.¹⁴ Untuk mengetahui keberhasilan ligasi maka pengamatan dilakukan sesudah melakukan transformasi *E. coli* DH5 α dengan plasmid pJET1.2/*blunt* rekombinan dan dibiakkan dalam media seleksi sehingga mampu membentuk koloni. Koloni yang dapat tumbuh pada media seleksi ini merupakan salah satu parameter yang menunjukkan bahwa DNA target masuk ke dalam pJET1.2/*blunt*.

Transformasi tersebut merupakan metode penginsersian materi genetik ke dalam sel bakteri melalui *direct uptake* dari lingkungan. *Heat shock transformation* adalah metode memasukan plasmid rekombinan ke dalam sel kompeten *E. coli* DH5 α dengan cara memberi kejutan panas. Pemanasan dilakukan untuk membuat pori sel membuka. Suhu 42°C digunakan karena *E. coli* masih bisa bertahan pada suhu tersebut, di atas suhu 42°C kemampuan *E. coli* untuk mengambil DNA menurun bahkan dapat menyebabkan sel *E. coli* mati.¹³ Dengan terdapat ampisilin, maka *E. coli* yang dapat tumbuh adalah koloni yang mengandung plasmid pJET1.2/*blunt* karena plasmid ini mempunyai gen resisten ampisilin. Dengan demikian, pembuatan sel kompeten sudah tepat, proses ligasi pun telah terjadi yang dibuktikan dengan keberadaan DNA target dalam plasmid yang selanjutnya membutuhkan proses konfirmasi untuk validasi. Masuknya gen *insert* ke dalam plasmid menyebabkan gen *lethal* (*eco417R*) menjadi rusak dan tidak terekspresi, sehingga sel tetap hidup. Gen *lethal* terletak pada sekuen *multi cloning site* (MCS) yang terdapat di pJET1.2/*blunt*, gen *lethal* akan diekspresikan jika tidak ada DNA target yang masuk di-sekuens MCS. Faktor berikutnya yang menjadi kunci keberhasilan transformasi adalah proses *heat shock transformation* yang sudah tepat sehingga plasmid yang sudah diinsersi dengan DNA target masuk ke dalam sel kompeten. Hal ini menyebabkan sel mampu tumbuh pada medium LB padat yang diberi ampisilin dan IPTG karena sel mengandung plasmid rekombinan yang resisten terhadap ampisilin serta induksi IPTG yang apabila daerah MCS diisi oleh gen *insert*, maka gen *lethal* tidak akan terekspresikan dan menyebabkan koloni berwarna putih^{14,15}.

Transformasi dilakukan dengan metode *heat shock*, yaitu dengan melakukan perubahan suhu secara ekstrem. Hal ini karena kejutan panas dapat membantu DNA dalam melewati dinding sel bakteri mengingat DNA adalah molekul yang sangat hidrofil sehingga secara normal DNA tidak dapat melewati dinding sel bakteri. Bakteri

hasil transformasi ditumbuhkan selama 16 jam pada suhu 37°C dalam media seleksi LB padat yang telah ditambahkan antibiotik ampisilin dan IPTG.

Berdasarkan atas hasil pengamatan proses transformasi berhasil dilakukan. Hal ini ditandai dengan terdapat koloni yang tumbuh sebanyak 17 koloni medium LB padat dengan kandungan ampisilin, IPTG. Dengan demikian, pembuatan sel kompeten sudah tepat sehingga sel dapat menerima atau mengambil DNA. Faktor lain yang menjadi kunci keberhasilan transformasi adalah proses *heat shock transformation* yang sudah tepat sehingga plasmid yang sudah diinsersi dengan DNA target masuk ke dalam sel kompeten.

Koloni bakteri *E. coli* DH5 α yang mengandung plasmid rekombinan diseleksi berdasar atas pembentukan koloni putih. Koloni target adalah koloni putih yang mengandung transforman, dimana gen *lethal* disisipi oleh fragmen *MSP1* sehingga tidak terekspresi dan menyebabkan koloni tetap berwarna putih. Jadi, koloni yang mengandung plasmid rekombinan ialah koloni yang berwarna putih. Kontrol negatif dimaksudkan untuk dapat mengetahui terjadi kontaminasi selama transformasi.

Isolasi plasmid bertujuan mengisolasi plasmid rekombinan dari sel kompeten. Isolasi plasmid menggunakan beberapa larutan, yaitu larutan resuspensi yang berfungsi untuk melarutkan sel, larutan ini berisi Tris yang berfungsi sebagai larutan penyangga, EDTA yang berfungsi mengikat kofaktor agar DNA tidak didegradasi oleh DNase dan glukosa untuk menjaga tekanan osmosis sel larutan. larutan lisis berfungsi melepaskan plasmid dari sel *E. coli* DH5 α . Larutan ini berisi SDS yang berfungsi mengikat membran sel, NaOH berfungsi memecahkan dinding sel dan mendenaturasi DNA untuk memisahkan DNA plasmid dan DNA kromosom. Larutan netralisasi berfungsi menetralkan larutan agar DNA plasmid dapat direnaturasi sehingga DNA plasmid dapat terikat pada membran silika di *spin column*. Larutan pencuci yang mengandung etanol berfungsi mengendapkan DNA plasmid pada membran silika dan juga menghilangkan garam-garam dan pengotor lainnya. Larutan elusi berfungsi melarutkan DNA plasmid yang terikat pada membran silika.¹⁶ Berdasar atas hasil elektroferogram pada gel agarosa, isolasi plasmid pJET1.2/*blunt* yang diinsersi dengan gen *MSP1* kemungkinan besar berhasil dilakukan. Hal ini ditandai dengan pita yang terbentuk. Dari hasil elektroferogram dapat dilihat bahwa pita yang muncul lebih dari satu. Pita-pita tersebut

merupakan plasmid dengan konformasi yang berbeda-beda. Konformasi plasmid dapat berupa *covalently closed circular*, *open circular* serta *supercoil*, dan masing-masing mempunyai kecepatan migrasi yang berbeda.¹⁴ Untuk mengetahui keberadaan gen *insert* di dalam plasmid yang sudah diisolasi harus dikonfirmasi, yang dilakukan dengan teknik PCR.

Tujuan konfirmasi hasil transformasi adalah mengetahui keberadaan gen *MSP1* dalam pJET1.2/*blunt* PCR. Hal ini juga merupakan salah satu cara untuk melihat keberhasilan integrasi gen sisipan dalam plasmid dengan menggunakan primer yang spesifik untuk gen sisipan. Konfirmasi keberadaan gen *MSP1* dalam pJET1.2/*blunt* hasil transformasi dengan PCR berhasil dilakukan. Dari total 10 koloni yang ditumbuhkan dalam kultur cair, kemudian diisolasi plasmid dan dikonfirmasi dengan PCR didapatkan pita pada hasil elektroferogram dengan ukuran 1.000 bp yang lebih tepatnya 1.049 bp yang menunjukkan terdapat gen *MSP1* dalam plasmid. Hal tersebut menunjukkan bahwa gen *MSP1* berhasil diinsersi ke dalam pJET1.2/*blunt*.

Hasil elektroforesis pada Gambar 6 telah didapatkan pita yang berukuran sama dengan gen *insert*, yaitu 1.049 bp yang berada pada lajur sampel 1, 11, dan 12. Sementara lajur sampel yang lain tidak terlihat, diduga karena terdapat kontaminasi yang berasal dari sisa reagen reaksi PCR dan kontaminasi saat inokulasi serta *mixing*. Secara umum, konfirmasi keberadaan gen *MSP1* dalam pJET1.2/*blunt* hasil transformasi dengan PCR berhasil dilakukan. Dari koloni yang ditumbuhkan dalam kultur cair, kemudian diisolasi plasmid dan dikonfirmasi dengan PCR didapatkan pita pada hasil elektroforesis dengan ukuran 1.000 bp yang lebih tepatnya 1.049 bp yang menunjukkan gen *MSP1*. Hal tersebut menunjukkan bahwa gen *MSP1* berhasil diinsersi ke dalam pJET1.2/*blunt*. Akan tetapi, untuk lebih meyakinkan dan memvalidasi keberadaan gen *insert* tersebut adalah benar maka sampel tersebut perlu proses analisis selanjutnya, yaitu dengan sekuensing untuk memperoleh urutan DNA yang akan disejajarkan dengan bank data yang ada.

Daftar Pustaka

1. WHO. World Malaria Report. World Health Organization. Malaria eradication on the agenda at the 141st WHO Executive Board meeting; 2014.
2. Irawati N. Genetic Polymorphism of merozoite surface protein-1 (MSP1) block2 allelic types in plasmodium falciparum field isolates from mountain and coastal area in West Sumatera. Med J Indones. 2011; 20(1):11-4.
3. De Groot GA, During HJ, Maas JW, Schneider H, Vogel JC, Erkens RHJ. Use of rbcL and trnL-F as a two-locus DNA barcode for identification of NW-European ferns: an ecological perspective. PloS ONE. 2011;20(6):1-10.
4. Bharti PK, Shukla MM, Sharma YD, Singh N. Genetic diversity in the block 2 region of the merozoite surface protein-1 of Plasmodium falciparum in central India. Malar J. 2012; 11(1):1-7.
5. Sumari D, Hosea KM, Mugasa JP, Abdulla S. Genetic diversity of Plasmodium falciparum strains in children under five years of age in Southeastern Tanzania. Open Tropic Med J. 2010;3(5):10-4.
6. Kiwanuka GN. Genetic diversity in Plasmodium falciparum merozoite surface protein 1 and 2 coding genes and its implications in malaria epidemiology: a review of published studies from 1997-2007. J Vector Borne Dis. 2009;46(1):1-12.
7. Cowman AF, Berry D, Baum J. The cellular and molecular basis for malaria parasite invasion of the human red blood cell. J Cell Biol. 2012;198(6):961-71.
8. Schoepflin S, Valsangiacomo F, Lin E, Kiniboro B, Mueller I, Felger I. Comparison of Plasmodium falciparum allelic frequency distribution in different endemic settings by high-resolution genotyping. Malar J. 2009;8(1):1-8.
9. Osier FH, Murungi LM, Fegan G, Tuju J, Tetteh KK, Bull PC, dkk. Allele-specific antibodies to Plasmodium falciparum merozoite surface protein-2 and protection against clinical malaria. Parasite Immunol. 2010;32(3):193-201.
10. Tu Z, He G, Li KX, Chen MJ, Chang J, Chen L, dkk. An improved system for competent cell preparation and high efficiency plasmid transformation using different escherichia coli strains. Electronic J Biotechnol. 2005; 8(1):113-20.
11. Ghanchi NK, Martensson A, Ursing J, Jafri S, Bereczky S, Hussain R, dkk. Genetic diversity among Plasmodium falciparum field isolates in Pakistan measured with PCR genotyping of the merozoite surface protein 1 and 2. Malar J. 2010;9(1):1-6.
12. Poh JJ, Gan SKE. The determination of

- factors involved in column based nucleic acid extraction and purification. *J Bioprocess Biotechniq.* 2014;4(3):1-6.
13. Zhang H, Zhang Z, Li J, Cai S. Effects of Mg²⁺ on supported bilayer membrane on a glassy carbon electrode during membrane formation. *Int J Electrochem Sci.* 2007;2(2007):788-96.
 14. Heidari A, Keshavarz H, Rokni MB, Jelinek T. Genetic diversity in merozoite surface protein (MSP)-1 and MSP-2 genes of *Plasmodium falciparum* in a major endemic region of Iran. *Korean J Parasitol.* 2007;45(1):59-63.
 15. Zakeri S, Mehrizi AA, Zoghi S, Djadid ND. Non-variant specific antibody responses to the C-terminal region of merozoite surface protein-1 of *Plasmodium falciparum* (Pf MSP119) in Iranians exposed to unstable malaria transmission. *Malar J.* 2010;9(1):1-8.
 16. Sutton PL, Clark EH, Silva C, Branch OH. The *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein 1 19 kd antibody response in the Peruvian Amazon predominantly targets the non-allele specific, shared sites of this antigen. *Malar J.* 2010;9(1):1-13.