

**STRATEGI KLONING DAN EKSPRESI GEN *var2csa*
PADA SISTEM *Escherichia coli* SEBAGAI LANGKAH PENDAHULUAN
UNTUK EKSPRESI GEN PADA SISTEM EUKARIOT TANAMAN**

**Cloning and Expression Strategy of *var2csa* Gene in *Escherichia coli* System
as Initial Step for Gene Expression in Plant Eukaryotic System**

Oleh:

Sapto Nugroho Hadi¹ dan Rintis Noviyanti²

¹Program Studi Agroteknologi, Fakultas Pertanian Unsoed, Jl. Dr. Soeparno Purwokerto

²Lembaga Biologi Molekuler Eijkman, Jl. Diponegoro 69 Jakarta

Alamat korespondensi: Sapto Nugroho Hadi (snhadi@gmail.com)

ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan mengetahui apakah strategi yang digunakan dapat berhasil mengkloning dan mengekspresikan sekuen DNA target (daerah DBL3x gen *var2csa*) pada inang *E.coli*. Strategi kloning dilakukan melalui tahapan: perbanyakan sekuen DNA target melalui teknik PCR menggunakan primer yang didesain sendiri, peligasian sekuen DNA target pada vektor kloning pCR2.1®-TOPO®, dan memperbanyaknya pada inang *E.coli* TOP10. Strategi ekspresi dilakukan melalui tahapan: perbanyakan sekuen DNA target melalui teknik PCR menggunakan primer yang mengandung situs pengenalan enzim restriksi endonuklease tipe II: *NcoI* dan *XhoI*, pemotongan dengan enzim *NcoI* dan *XhoI*, peligasian pada vektor ekspresi pET-28a (+), dan pengekspresian pada inang *E. coli* BL21 (DE3) dengan induser *isopropyl-1-thio-β-D-galactoside* (IPTG) 1 mM. Strategi kloning berhasil mendapatkan sekuen daerah DBL3x gen *var2csa* berukuran 948 pb. Strategi ekspresi berhasil mendapatkan protein DBL3x berukuran 38 kDa.

Kata kunci: kloning, ekspresi, DBL3x, *var2csa*, *Escherichia coli*

ABSTRACT

The objective of this study is to see are the strategies approach that used successfully clone and express DBL3x region of var2csa gene in E.coli host. The cloning strategies are amplifying DNA target through PCR technique using self design oligonucleotide primer, inserting into cloning vector pCR2.1®-TOPO®, copying in E.coli TOP10 host. The expression strategies are amplifying DNA target through PCR using self design primer with specific site for restriction enzyme NcoI and XhoI, digesting with NcoI and XhoI, inserting into pET-28a (+) expression vector, and expressing in E. coli BL21 (DE3) host by adding isopropyl-1-thio-β-D-galactoside (IPTG) 1 mM as a inducer. This study successfully cloned DBL3x region of var2csa gene with 948 pb in size and successfully expressed protein DBL3x with 38 kDa in size in E.coli system.

Keywords: cloning, expression, DBL3x, var2csa, Escherichia coli

PENDAHULUAN

Bakteri *Escherichia coli* merupakan bakteri gram negatif yang banyak dimanfaatkan untuk berbagai kepentingan. Salah satunya adalah penggunaannya sebagai tempat diproduksinya protein asing (heterologous) (Kuchenreuther *et al.*, 2010; Natarajan *et al.*, 2011). Protein asing yang diproduksi pada *E.coli* dapat berasal dari

gen yang bersumber dari sel prokariot (Šnajder *et al.*, 2015) ataupun sel eukariot (Nausch *et.al.*, 2013; Peng *et al.*, 2013). Umumnya sel *E.coli* digunakan digunakan sebagai inang (*host*) pendahuluan sebelum ekspresi lebih lanjut protein heterologous pada inang yang lebih kompleks, misalnya sel eukariot tanaman. Ekspresi protein heterologous pada inang eukariot dipilih

pada tahap lanjutan karena kelebihanya dibanding inang prokariot, yaitu keberadaan sistem modifikasi pasca translasi protein yang dimiliki sehingga protein heterologous yang dihasilkannya dapat berbentuk seperti aslinya, baik struktur maupun keaktifannya secara biologi (Badosa *et.al.*, 2013). Ekspresi tingkat lanjut pada inang eukariot memiliki tingkat kerumitan yang tinggi (Ivashuta *et al.*, 2011), oleh karena itu sel prokariot seperti bakteri *E.coli* dipilih sebagai inang pendahuluan.

Bakteri *E.coli* dijadikan pilihan pertama dan utama untuk kloning dan ekspresi pendahuluan gen heterologous dikarenakan beberapa kelebihan yang dimilikinya. Bakteri *E.coli* mudah dan cepat ditumbuhkan, biaya relatif tidak mahal, mudah ditoleransi oleh sebagian besar protein asing, memiliki tingkat ekspresi yang tinggi (Sambrook & Russel, 2001), dan secara genetik sudah dikarakterisasi dengan baik (Baneyx, 1999).

Meskipun inang *E.coli* memiliki beberapa kelebihan untuk mengkloning dan mengekspresikan protein heterologous terutama yang bersumber dari sel eukariot, namun keberhasilannya ditentukan banyak faktor. Salah satunya adalah ketepatan penggunaan strategi yang diterapkan. Ketidaktepatan strategi kloning dan ekspresi yang dipilih menyebabkan keberhasilan kloning dan ekspresi gen

heterologous pada skala praktek menjadi berkurang atau bahkan gagal (Rosano & Eduardo, 2014). Pada penelitian ini gen *var2csa* bersumber dari protozoa (sel eukariot) diklon dan diekspresikan pada inang sel prokariot *E.coli* sebelum diekspresikan pada inang sel eukariot. Strategi yang digunakan dalam penelitian ini terbagi menjadi dua, yaitu strategi kloning dan strategi ekspresi. Strategi kloning dilakukan dengan pengisolasian DNA protozoa, perbanyakan sekuen DNA target menggunakan teknik *Polymerase Chain Reaction* (PCR) dengan primer yang didesain sendiri, ligasi pada vektor kloning, perbanyakan pada inang *E.coli*, dan seleksi *E.coli* yang sudah mengandung sekuen DNA target menggunakan beberapa penanda molekuler. Strategi ekspresi dilakukan dengan perbanyakan sekuen DNA target melalui PCR dengan primer yang didesain sendiri sehingga memiliki daerah pemutusan enzim restriksi, ligasi pada vektor ekspresi, perbanyakan, seleksi, dan ekspresi pada inang *E.coli*. Rumusan dalam penelitian ini adalah apakah strategi yang digunakan dapat berhasil mengkloning dan mengekspresikan sekuen DNA target pada inang *E.coli*?

Tujuan penelitian ini adalah mengetahui apakah strategi yang digunakan dapat berhasil mengkloning dan mengekspresikan sekuen DNA target (daerah DBL3x gen *var2csa*) pada inang

E.coli. Penelitian ini diharapkan memberikan informasi penting untuk dapat dijadikan bahan pertimbangan dalam mengkloning dan mengekspresikan gen heterologus eukariot pada sel inang prokariot *E. coli*.

METODE PENELITIAN

Untuk strategi kloning, sekuen DNA target, yaitu daerah DBL3x gen *var2csa* *P. falciparum* dengan panjang 948 pb diamplifikasi (diperbanyak) dengan teknik *polymerase chain reaction* (PCR) sesuai metode Saiki *et al.* (1988) yang telah dimodifikasi. Program PCR yang digunakan adalah tahap pre-denaturasi: 94°C (5 menit), 48°C (30 detik), 72°C (2 menit), tahap denaturasi: 94°C (1 menit), tahap *annealing* primer: 48°C (1 menit), dan tahap pemanjangan (sintesis): 72°C (1 menit), 72°C (5 menit). PCR berlangsung dalam 35 siklus. Primer untuk teknik PCR didesain spesifik target memanfaatkan beberapa *software* seperti *BioEdit Sequence Alignment Editor* (<http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html>) dan *PerlPrimer v1.1.21* (<http://perlprimer.sourceforge.net/download.html>). Sekuen primer hasil desain adalah F3x-3D7 (5'-ACCAATAAT AAAATGAAATCAA-3') dan R3x-3D7 (5'-TCCTACATATTTATTTTCATAT-3'). Sekuen target hasil amplifikasi PCR dimurnikan menggunakan metode *QIAquick Gel Extraction Kit* (Qiagen,

2006). Sekuen target yang murni diligasikan pada vektor kloning pCR[®] 2.1-TOPO[®] (Invitrogen) menghasilkan molekul rekombinan. Molekul rekombinan lalu ditranformasikan ke dalam sel inang *E.coli* TOP 10 (Invitrogen) melalui metode kejutan-panas. Seleksi sel inang yang mengandung sekuen target dilakukan dengan penumbuhan bakteri pada media LB agar yang mengandung antibiotik ampisilin (konsentrasi akhir 100 µg/mL) dan teknik *blue-white screening*. Konfirmasi terakhir keberadaan sekuen target pada sel inang *E.coli* dilakukan dengan metode *PCR colony* menggunakan primer universal M13F TOPO (5'-GTAAAACGACGG CCAG-3') dan M13R TOPO (5'-CAG GAAACAGCTATGAC-3').

Untuk strategi ekspresi, sekuen DNA target yang berhasil diklon pada sel inang *E.coli* dicek kebenaran susunan nukleotidanya menggunakan teknik sekuensing berdasarkan metode Sanger *et al.* (1977) dimodifikasi melalui perangkat *Automatic DNA Sequencer ABIPrism 377* (Perkin Elmer). Sekuen DNA target yang telah dicek kebenaran susunan nukleotidanya diamplifikasi dengan teknik PCR menggunakan primer yang didesain spesifik sehingga memiliki situs pengenalan pemotongan enzim restriksi endonuklease *NcoI* dan *XhoI*. Primer hasil desain yang digunakan adalah F3x-Nco (5'-

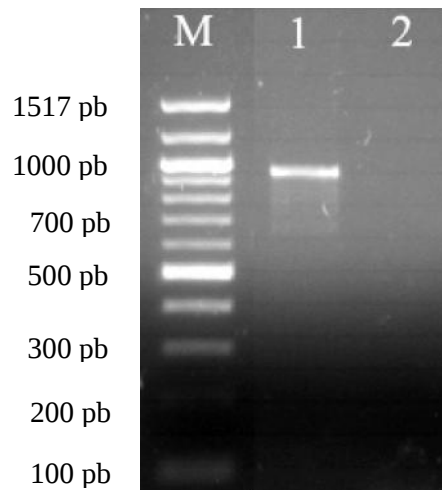
GCATccatggGAACCAATAATAAAATGAAATCAAGT-3') dan R3x-Xho (5'-GCCCctcgagTCCTACATATTTATTTTCATATTTTG-3'). Sekuen DNA target dipotong dengan enzim *NcoI* dan *XhoI* (10 unit/ μ l) dan diligasi pada vektor ekspresi pET28a (+) (Novagen) menghasilkan molekul rekombinan. Molekul rekombinan ditransformasi melalui metode kejut-panas ke dalam sel inang *E.coli* BL21 (DE3). Seleksi keberadaan sekuen target pada sel inang *E.coli* BL21 (DE3) dilakukan dengan penumbuhan sel *E.coli* pada media LB agar yang mengandung antibiotik kanamisin (konsentrasi akhir 25 μ g/ml) dan metode PCR colony. Sel inang *E.coli* yang mengandung molekul rekombinan dengan sekuen target terdapat di dalamnya dikultur pada media LB cair yang mengandung 0,2% glukosa dan 25 μ g/ml kanamisin semalam (37°C, 300 rpm). Setelah OD600 kultur sel mencapai kisaran 0.6-0.8, sel *E.coli* dicuci menggunakan media LB cair yang baru untuk menghilangkan kandungan glukosa di dalamnya. Sel *E.coli* yang telah dicuci dikultur kembali pada media LB cair yang mengandung *isopropyl- β -thiogalactosidase* (IPTG) 1 mM untuk diinduksi ekspresi protein targetnya. Induksi ekspresi dilakukan beberapa jam untuk memonitor keberadaan protein hasil ekspresi.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Strategi Kloning

Hasil amplifikasi sekuen DNA target, daerah DBL3x gen *var2csa* melalui teknik PCR menggunakan primer F3x-3D7 dan R3x-3D7 disajikan pada Gambar 1. Hasil ini menunjukkan primer F3x-3D7 dan R3x-3D7, pada kondisi PCR yang sesuai berhasil secara spesifik mendeteksi sekuen target. Primer ini dapat mengikat secara komplemen pada sekuen DNA cetakan sehingga proses perbanyakan sekuen DNA baru dapat dilakukan oleh enzim DNA polimerase. Keberadaan DNA target yang berhasil diperbanyak secara *in vitro* (PCR) dibuktikan dengan adanya pita DNA target pada posisi yang sesuai (Sambrook & Russell, 2001; Lodge *et al.*, 2007). Hasil ini juga membuktikan bahwa strategi desain primer F3x-3D7 dan R3x-3D7 yang digunakan berjalan dengan tepat.

Untuk sekuen DNA target dengan kandungan basa A+T yang kaya, seperti pada daerah DBL3x gen *var2csa* yang mencapai 80,6% (Hyman *et al.*, 2002), desain primer harus dilakukan dengan hati-hati. Untuk mengatasi permasalahan lemahnya ikatan hidrogen yang terbentuk antara basa A dan T, maka primer didesain melalui bantuan beberapa *software* bioinformatika seperti BioEdit dan PerlPrimer. Pada penelitian ini, *software* BioEdit digunakan untuk mensejajarkan



Gambar 1. DBL3x gen *var2csa* hasil amplifikasi PCR. M: 100 pb DNA *Ladder* sebagai pita DNA standard, 1: Pita DNA daerah DBL3x 948 pb, 2: Kontrol Negatif. 4 μ l produk PCR + 3 μ l

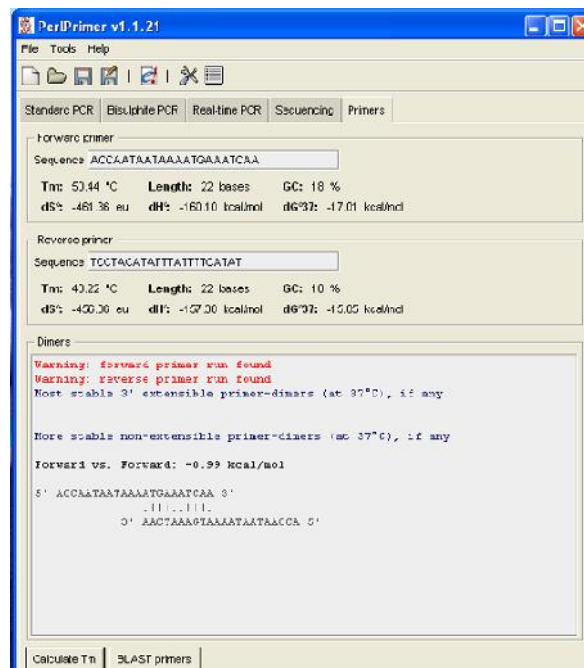
beberapa sekuen DNA target dari berbagai sumber untuk mencari daerah *conserve* (tetap) yang akan dijadikan target amplifikasi (perbanyak) dengan PCR, sedangkan *software* PerlPrimer digunakan untuk mengetahui karakteristik primer yang didesain agar menempel pada sekuen target secara optimum. Menurut Hall (1999), program BioEdit terintegrasi dengan program bioinformatika lainnya seperti ClustalW, BLAST yang memungkinkan peneliti dapat mensejajarkan banyak sekuen DNA secara bersamaan dan mencari kedekatannya dengan data yang tersedia di *gene bank* secara akurat, mudah dioperasikan, bersifat *open source* (tidak berbayar), dan yang terpenting memiliki tingkat ketepatan yang tinggi. Sementara itu, program PerlPrimer menurut Marshall (2004) memiliki beberapa keunggulan dalam mengkarakterisasi suatu primer, yaitu ketepatan yang tinggi dalam

mengkalkulasi nilai *melting temperature* (T_m) yang dibutuhkan dalam mengestimasi suhu *annealing* (penempelan) primer pada DNA cetakan untuk perbanyak melalui PCR dan dapat memprediksi kemungkinan terbentuknya dimer primer (antarprimer saling menempel sendiri) yang dapat mengurangi tingkat spesifitas primer. Hasil karakterisasi primer hasil desain dengan *software* PerlPrimer disajikan pada Gambar 2. Berdasarkan hasil pada Gambar 2 dapat diketahui bahwa primer F3x-3D7 dan R3x-3D7 memiliki T_m 50,44 °C dan 48,22°C, panjang primer 22 basa, kandungan basa GC 18%, dan tidak diketemukannya kemungkinan terjadinya penempelan yang kuat antarprimer (dimer primer). Karakteristik primer yang didapatkan sesuai dengan parameter optimal desain primer untuk PCR (Remm *et al.*, 2004), kecuali karakter kandungan GC yang lebih rendah (<50%) karena ada penyesuaian

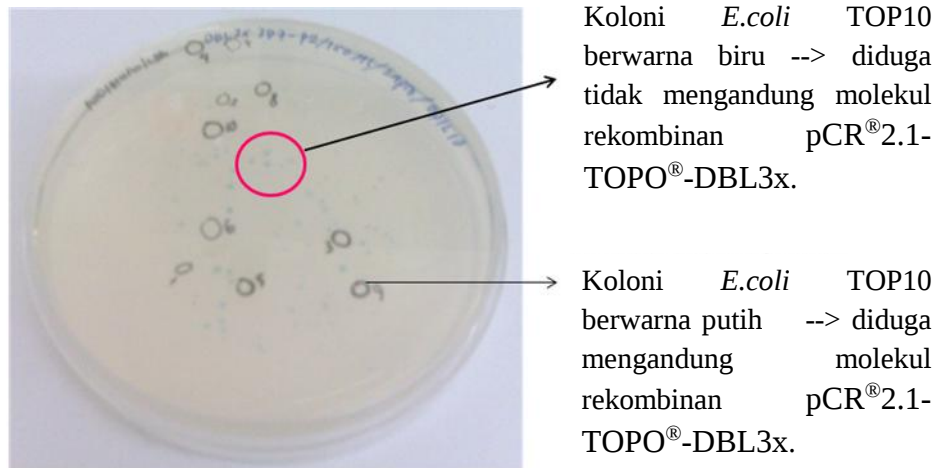
dengan kandungan GC pada DNA cetakan yang kurang dari 20%.

Sekuen DNA target yang telah diperbanyak dengan teknik PCR dan dimurnikan disisipkan pada vektor kloning pCR[®] 2.1-TOPO[®]. Strategi pemilihan vektor kloning didasarkan pada karakteristik yang dimiliki vektor seperti kemampuan disisipi sekuen DNA target pada ukuran sesuai, memiliki marka genetik untuk keperluan seleksi, dan jumlah *copy* yang tinggi (Lodge *et al.*, 2007). Alasan lain pemilihan vektor kloning pCR[®] 2.1-TOPO[®] adalah adanya mekanisme penyambungan sekuen DNA dengan bantuan katalisis dari enzim topoisomerase sehingga proses ligasi sekuen DNA target dan DNA vektor menjadi molekul rekombinan dapat terjadi lebih sederhana,

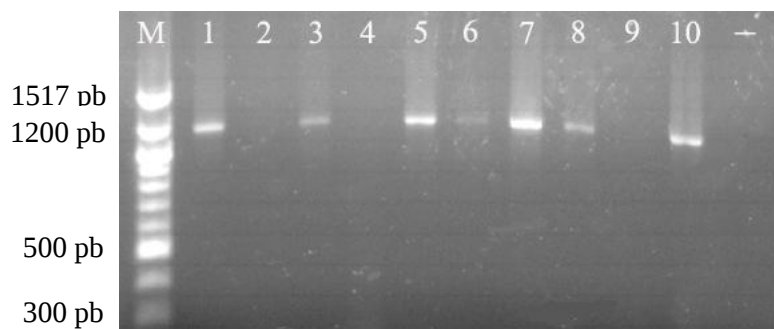
cepat, dan efektif (Shuman, 1991; Shuman, 1994). Keberhasilan strategi kloning dapat dilihat dari keberadaan molekul rekombinan pCR[®]2.1-TOPO[®]-DBL3x (gabungan dari vektor pCR[®] 2.1-TOPO[®] dan daerah DBL3x gen *var2csa*) pada inang yang digunakan, yaitu *E.coli* TOP10. Keberadaan molekul rekombinan ditandai oleh adanya perbedaan warna pada koloni *E.coli* TOP 10 (Gambar 3). Perbedaan ini dapat dimungkinkan karena vektor plasmid yang digunakan mengandung gen *lacZα* (suatu marka genetik) yang apabila disisipi DNA target akan menyebabkannya kehilangan kemampuan menghasilkan enzim β-galaktosidase sehingga koloni bakteri akan berwarna putih meskipun media ditambahkan senyawa X-gal sebagai substrat dari enzim (Lodge *et al.*, 2007).



Gambar 2. Karakteristik primer *forward* F3x-3D7 dan *Reverse* R3x-3D7 dilihat menggunakan *software* PerlPrimer v1.1.21.



Gambar 3. Koloni *E.coli* TOP10 hasil kloning di dalam media LB agar mengandung ampisilin dan X-gal. Koloni berwarna putih dilabel dengan penomoran 1-10.



Gambar 4. Hasil PCR terhadap koloni *E.coli* TOP10 warna putih untuk identifikasi sekuen DNA target. M: 100 pb DNA *Ladder* sebagai pita DNA standard. No. 1-10 : koloni *E.coli* yang diduga mengandung daerah DBL3x, - : Kontrol negatif. 7 μ l produk PCR + 3 μ l bufer *loading* dianalisis pada elektroforesis gel agarosa 1%, 90 Volt, 40 menit. Koloni No. 1, 3, 5, 6, 7, 8, dan 10 menunjukkan hasil positif dengan adanya pita DNA berukuran 1150 pb (hasil penjumlahan 948 pb daerah DBL3x + 202 pb sekuen vektor pCR[®]2.1-TOPO[®] yang diamplifikasi primer M13F TOPO dan M13R TOPO).

Untuk memastikan keberadaan molekul rekombinan pCR[®]2.1-TOPO[®]-DBL3x dalam koloni *E.coli* TOP10 berwarna putih, strategi yang dilakukan adalah melakukan analisis PCR *colony*. Pada teknik PCR *colony*, primer yang digunakan memiliki kemampuan kuat menempel (komplemen) dengan sekuen DNA vektor, sehingga jika di dalam koloni bakteri terdapat molekul rekombinan

pCR[®]2.1-TOPO[®]-DBL3x maka akan dihasilkan pita DNA pada posisi yang diinginkan. Hasil analisis PCR *colony* disajikan pada Gambar 4. Beberapa koloni *E.coli* TOP 10 berwarna putih menunjukkan keberadaan pita DNA pada panjang sekitar 1150 pb. Hasil ini menandakan strategi kloning yang dilakukan berhasil dengan baik.

DBL3x var2csa 3D7			
Query ID	Id 24769	Database Name	nr
Description	None	Description	All GenBank+EMBL+DBJ+PDB sequences (but no EST, STS, GSS, environmental samples or phase 0, 1 or 2 HTGS sequences)
Molecule type	nucleic acid	Program	BLASTN 2.2.25+ >Citation
Query Length	078		

Sequences producing significant alignments:			
Accession	Description	Max score	Total score
GQ465381.1	Plasmodium falciparum isolate X4A_5.a VAR2CSA (VAR2CSA) gene, pa	1740	1740
AE014168.3	Plasmodium falciparum 3D7 chromosome 12, complete sequence	1740	1740
XM_001350379.1	Plasmodium falciparum 3D7 erythrocyte membrane protein 1, PfEMP1	1740	1740
GQ465384.1	Plasmodium falciparum isolate X4A_22.a VAR2CSA (VAR2CSA) gene, f	1718	1718
GQ465422.1	Plasmodium falciparum isolate XJA_247.c VAR2CSA (VAR2CSA) gene,	1384	1384
GQ465421.1	Plasmodium falciparum isolate XJA_247.b VAR2CSA (VAR2CSA) gene,	1384	1384
GQ903566.1	Plasmodium falciparum isolate HCS3-G7.c VAR2CSA (VAR2CSA) gene,	1345	1345
GQ903562.1	Plasmodium falciparum isolate HCS3.a VAR2CSA (VAR2CSA) gene, par	1345	1345
GQ465426.1	Plasmodium falciparum isolate XJA_255.c VAR2CSA (VAR2CSA) gene,	1345	1345
GQ465417.1	Plasmodium falciparum isolate XJA_187.b VAR2CSA (VAR2CSA) gene,	1345	1345
GQ465424.1	Plasmodium falciparum isolate XJA_255.a VAR2CSA (VAR2CSA) gene,	1334	1334
E7614230.1	Plasmodium falciparum isolate KMwII VAR2CSA gene, partial cds	1334	1334

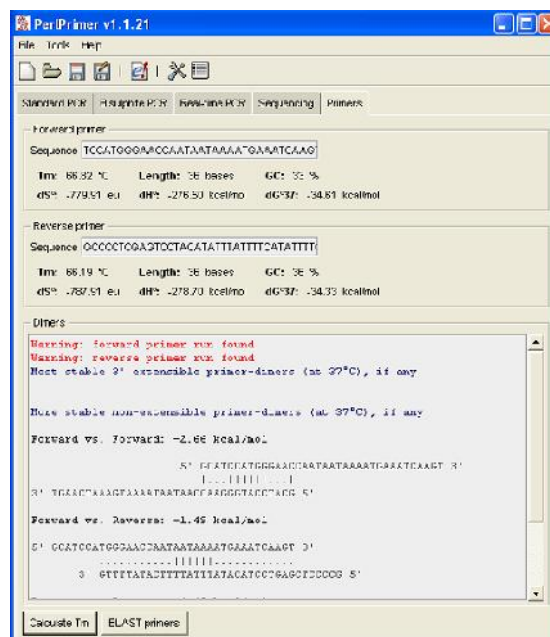
Gambar 5. Hasil analisis sekuen DBL3x gen *var2csa* produk kloning dengan program blast-n. Gen target DBL3x memiliki kedekatan 92-99% dengan data base DNA yang tersedia (lingkaran).

Sekuen DNA target yang berhasil diklon pada inang *E.coli* TOP10 dikonfirmasi susunan nukleotidanya melalui teknik sekuensing dan dibandingkan dengan susunan nukleotida yang terdapat pada *gene bank* memanfaatkan program bioinformatika blast-n (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) (Zheng *et al.*, 2000). Hasil yang disajikan pada Gambar 5 menunjukkan sekuen DNA target yang berhasil diklon memiliki tingkat kemiripan 92-99% dengan data base DNA yang tersedia (Morgulis *et al.*, 2008).

Strategi Ekspresi

Strategi ekspresi sekuen DNA target diawali dengan didesain primer. Primer dirancang mengandung situs pengenalan enzim restriksi endonuklease tipe II, yaitu *NcoI* dan *XhoI*. Keberadaan kedua daerah ini diharapkan memudahkan proses ligasi

(penyambungan) sekuen DNA target ke dalam vektor plasmid ekspresi yang digunakan. Strategi desain primer serupa dengan tahap kloning memanfaatkan *software* BioEdit dan PerlPrimer. Perbedaannya di dalam primer ditambahkan situs pengenalan *NcoI* dan *XhoI*. Karakteristik primer yang didesain disajikan pada Gambar 6. Dari Gambar 6 diketahui nilai T_m primer 66,82°C dan 66,19°C, panjang 36 basa, kandungan GC 33%, dan tidak diketemukan kemungkinan terjadinya penempelan yang kuat antarprimer. Karakteristik primer yang didesain sesuai dengan parameter optimal desain primer untuk PCR (Remm *et al.*, 2004), kecuali pada kandungan GC yang lebih rendah dari 50% dan panjang primer melebihi 24 basa nukleotida. Menurut Judelson (2006), primer bekerja dengan baik (menempel pada sekuen DNA cetakan)



Gambar 6. Karakteristik primer *forward* F3x-Nco dan *Reverse* R3x-Xho dilihat menggunakan *software* PerlPrimer v1.1.21.

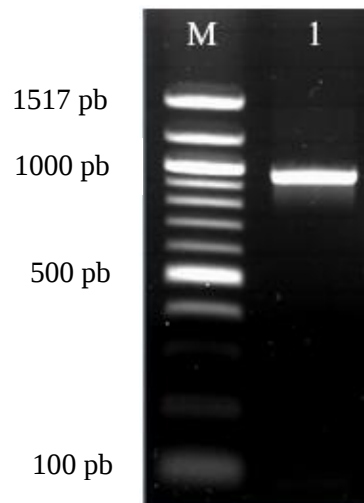
umumnya memiliki panjang 20-24 basa. Untuk mengatisipasi turunnya spesifitas primer, primer didesain memiliki basa nukleotida G atau C pada ujung 3' sekuenya. Keberadaan nukleotida G atau C pada ujung 3' primer dapat meningkatkan hasil amplifikasi PCR (Judelson, 2006).

Sekuen DNA target yang berhasil diperbanyak dengan teknik PCR menggunakan primer F3x-Nco dan R3x-Xho, selanjutnya dipotong dengan enzim restriksi endonuklease tipe II. Terdapat dua strategi yang digunakan. Strategi pertama, DNA produk PCR langsung dipotong dengan enzim *NcoI* dan *XhoI*. Hasil pemotongan enzim *NcoI* dan *XhoI* melalui strategi pertama disajikan pada Gambar 7. Strategi kedua, sebelum dilakukan pemotongan dengan enzim *NcoI* dan *XhoI*, sekuen DNA target dari hasil PCR terlebih

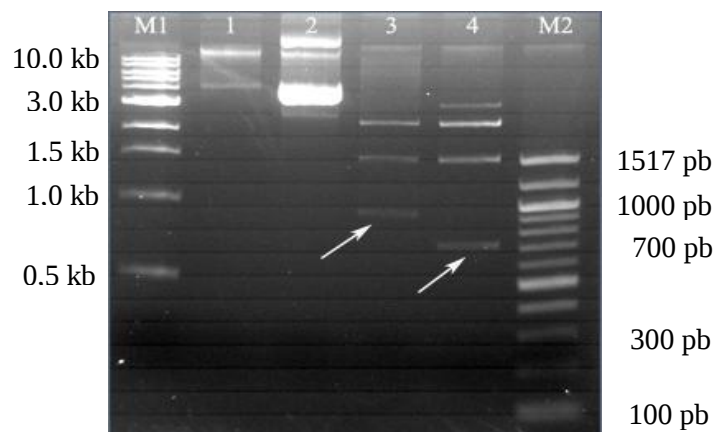
dahulu diligasikan pada vektor pCR[®]2.1-TOPO[®]. Molekul rekombinan yang didapatkan lalu dipotong dengan enzim *NcoI* dan *XhoI*. Hasil pemotongan enzim *NcoI* dan *XhoI* melalui strategi kedua disajikan pada Gambar 8. Dari kedua strategi ini, strategi kedua menjadi pilihan terbaik karena enzim dapat memotong sekuen DNA dengan baik dan dihasilkan produk pemotongan yang diinginkan (sekuen DNA berukuran 960 pb), sedangkan pada strategi pertama, enzim tidak berhasil memotong DNA. Ketidak berhasilan pemotongan enzim pada strategi pertama diduga karena enzim tidak mampu menempel pada situs pengenalnya secara tepat karena terlalu pendeknya jarak situs tersebut dari ujung sekuen DNA target produk PCR (hanya 5 basa nukleotida).

Pada penelitian ini digunakan enzim restriksi *NcoI* dan *XhoI*. Kedua enzim ini akan menghasilkan ujung lengket (*sticky end*) pada sekuen DNA target yang dipotong. Ujung lengket akan memperbesar peluang penempelan sekuen DNA target kepada DNA vektor ekspresi yang digunakan, dibandingkan enzim yang

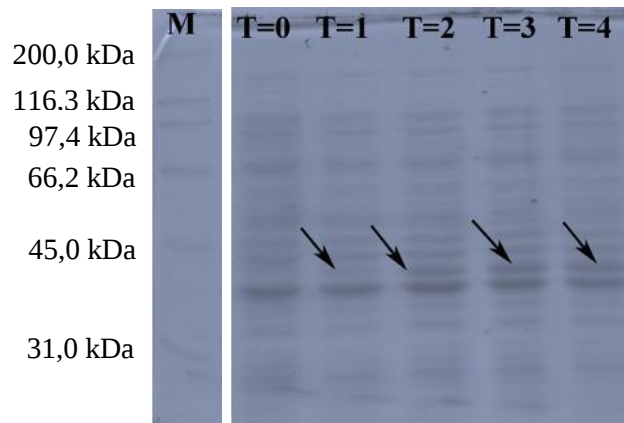
menghasilkan ujung tumpul (*blunt end*) (Pingoud & Albert, 2001). Selain itu, penggunaan dua enzim restriksi ini secara bersamaan akan menghindari kekeliruan arah penempelan sekuen DNA target pada DNA vektor ekspresi yang dapat mengakibatkan kesalahan pembacaan dalam proses ekspresi gen menjadi protein.



Gambar 7. Produk PCR DNA target yang dipotong secara langsung dengan enzim *NcoI* dan *XhoI* (lajur 1). Pita DNA Standard (M). Enzim tidak berhasil memotong sekuen DNA target.



Gambar 8. Hasil pemotongan molekul rekombinan pCR[®]2.1-TOPO[®]-DBL3x dengan enzim *NcoI* dan *XhoI*. M1: 1 kb DNA *Ladder* dan M2: 100 pb DNA *Ladder* sebagai pita DNA standard. Lajur 1: pCR[®]2.1-TOPO[®]-DBL3x dan 2: kontrol positif tanpa pemotongan enzim. 3: pCR[®]2.1-TOPO[®]-DBL3x dan 4: kontrol positif setelah pemotongan enzim. Tanda panah menunjukkan adanya pita DNA target dengan panjang 960 pb (DBL3x) dan 741 pb (kontrol positif). Deteksi dilakukan dalam gel agarosa 1%, 90 volt, 40 menit.



Gambar 9. Hasil ekspresi daerah DBL3x pada *E.coli* BL21 (DE3). M : Pita Protein Standard *Broad range*, T=0 : waktu induksi jam ke-0, T=1 : jam ke-1, T=2 : jam ke-2, T=3 : jam ke-3, T=4 : jam ke-4. Tanda panah menunjukkan adanya pita protein target yang semakin tebal seiring lamanya waktu induksi. Protein DBL3x diperkirakan berukuran 38 kDa. 10 μ l suspensi pellet dan 2x RSB SDS *buffer* diloading dalam gel poliakrilamida 10%, 2 jam, 60-100 volt.

Untuk keperluan ekspresi sekuen DNA target menjadi protein, sekuen DNA target yang telah dipotong enzim *NcoI* dan *XhoI* diligasikan pada vektor ekspresi pET28a (+). Strategi penggunaan sistem pET untuk ekspresi gen disebabkan oleh beberapa karakter unggul yang dimiliki vektor ekspresi tersebut seperti keberadaan promoter T7 yang dikenal kuat dan baik dalam mengekspresikan gen pada inang *E.coli*, adanya daerah pengenalan *NcoI* dan *XhoI* sebagai tempat penyisipan sekuen DNA target yang sudah mengandung daerah pengenalan yang sama, terdapat penanda genetik untuk keperluan seleksi, dan keberadaan sekuen 6x His untuk kemudahan pemurnian protein yang diekspresikan. Pada penelitian ini, ekspresi sekuen DNA target dilakukan pada inang *E.coli* BL21 (DE3). Inang ini populer dan

paling banyak digunakan untuk mengekspresikan protein rekombinan (Sorensen & Mortensen, 2005; Wang *et al.*, 2014). Menurut Sorensen & Mortensen (2005), latar belakang galur dan genetik dari inang ekspresi sangat penting. Inang *E.coli* BL21 (DE3) memiliki keunggulan, seperti defisiensi enzim protease yang dapat mendegradasi protein target, dapat memelihara vektor ekspresi secara stabil, dan memiliki kesesuaian genetik dengan sistem ekspresi yang ada.

Strategi ekspresi sekuen DNA target diawali dengan pemberian glukosa 0,2% pada media pertumbuhan inang *E.coli* BL21 (DE3) yang sudah mengandung sekuen DNA target. Glukosa dijadikan sebagai sumber energi untuk pertumbuhan dan pemeliharaan level ekspresi basal rendah oleh sel bakteri (Novagen, 2010).

Setelah sel *E.coli* BL21 (DE3) tumbuh dengan baik, senyawa glukosa dihilangkan dari media LB cair yang digunakan. Sebagai pengganti, ke dalam media ditambahkan senyawa IPTG dengan konsentrasi 1 mM. Senyawa ini berperan menginduksi ekspresi gen pada inang *E.coli*. Menurut Einsfeldt *et al.* (2011), konsentrasi IPTG memiliki pengaruh yang signifikan secara statistik terhadap ekspresi suatu protein heterologous. Proses induksi dilakukan dalam beberapa jam untuk memonitor keberadaan protein target sebagai hasil ekspresi. Hasil ekspresi sekuen DNA target menghasilkan protein target disajikan pada Gambar 9.

Dari hasil yang disajikan pada Gambar 9, sekuen DNA target (DBL3x) berhasil diekspresikan menghasilkan protein DBL3x yang berukuran sekitar 38 kDa (dibandingkan dengan pita protein standard). Waktu induksi empat jam (T=4) menghasilkan pita protein paling tebal dibandingkan waktu ekspresi satu jam (T=1), dua jam (T=2), dan tiga jam (T=3). Dari hasil ini dapat diketahui jumlah protein yang diekspresikan sebanding dengan waktu ekspresi. Semakin lama waktu induksi, semakin banyak protein yang diekspresikan oleh sel inang *E.coli* BL21 (DE3).

KESIMPULAN

Strategi kloning berhasil mendapatkan sekuen DNA target, daerah DBL3x gen *var2csa* dengan panjang 948 pb. Strategi ekspresi berhasil mendapatkan pita protein target, protein DBL3x dengan ukuran sekitar 38 kDa. Dengan demikian, strategi yang ditempuh dalam penelitian ini berhasil baik dalam mengkloning dan mengekspresikan sekuen DNA target DBL3x gen *var2csa* yang bersumber dari sel eukariot pada sistem inang prokariot *E.coli*.

DAFTAR PUSTAKA

- Badosa E., Moiset G., Montesinos L., Talleda M., Bardají E., Feliu L., Planas M., Montesinos E. 2013. Derivatives of the Antimicrobial Peptide BP100 for Expression in Plant Systems. *PLoS ONE*, 8(12): e85515. doi:10.1371/journal.pone.0085515
- Baneyx. 1999. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*. *Current Opinion in Biotechnology*, 10: 411-421.
- Einsfeldt K., Joao B.S.J., Ana P.C.A., Marco A.M., Tito L.M.A., Rodrigo V.A., Ariane L.L. 2011. Cloning and Expression of Protease ClpP from *Streptococcus pneumoniae* in *Escherichia coli*: Study of the influence of kanamycin and IPTG concentration on cell growth, recombinant protein production and plasmid stability. *Vaccine*, 29: 7136–7143
- Hall T.A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acid Symposium Series*, 41: 95-98.

- Hyman, R.M., Fung, E., Conway, A., Kurdi, O., Mao, J., Miranda, M., Nakao, B., Rowley, D., Tamaki, T., Wang, F., & Davis, R.W. 2002. Sequence of *Plasmodium falciparum* chromosome 12. *Nature*, 419: 534-537.
- Invitrogen. TOPO®TA Cloning®Kit, *Five-minute cloning of Taq polymerase-amplified PCR products*. Life Technologies Corporation.
- Ivashuta S., Banks I.R., Wiggins B.E., Zhang Y., Ziegler T.E., Roberts J.K., Heck G.R. 2011. Regulation of Gene Expression in Plants through miRNA Inactivation. *PLoS ONE* 6(6): e21330. doi:10.1371/journal.pone.0021330
- Judelson. 2006. Guidelines for Designing Primers. Diakses pada 22 Mei 2015.
- Kuchenreuther J.M., Grady-Smith C.S., Bingham A.S., George S.J., Cramer S.P., Swartz J.R. 2010. High-Yield Expression of Heterologous [FeFe] Hydrogenases in *Escherichia coli*. *PLoS ONE* 5(11): e15491. doi:10.1371/journal.pone.0015491
- Lodge J., Lund, P., and Minchin, S. 2007. *Gene Cloning Principle and Applications*. Taylor & Francis, Birmingham.
- Marshall. 2004. PerlPrimer: cross-platform, graphical primer design for standard, bisulphate, and real-time PCR. *Bioinformatics*, 20 (15): 2471-2472
- Morgulis A., George C., Yan R., Thomas L.M., Richa A., Alejandro A.S. 2008. Database Indexing for Production MegaBLAST Search. *Bioinformatics*, 24:1757-1764
- Natarajan C., Jiang X., Fago A., Weber R.E., Moriyama H., Jay F.S. 2011. Expression and Purification of Recombinant Hemoglobin in *Escherichia coli*. *PLoS ONE* 6(5): e20176. doi:10.1371/journal.pone.0020176
- Nausch H., Huckauf J., Koslowski R., Meyer U., Broer I., Mikscofsky H. 2013. Recombinant Production of Human Interleukin 6 in *Escherichia coli*. *PLoS ONE* 8(1):e54933. doi:10.1371/journal.pone.0054933
- Novagen. 2010. *pET System Manual* 11th Edition. EMD Chemicals, Inc., Darmstadt.
- Peng Z, Li L, Yang L, Zhang B, Chen G, Bi Y. 2013. Overexpression of Peanut Diacylglycerol Acyltransferase 2 in *Escherichia coli*. *PLoS ONE* 8(4): e61363. doi:10.1371/journal.pone.0061363
- Pingoud A. & Albert J. 2001. Structure and Function of Type II Restriction Endonuclease. *Nucleic Acids Research*, 29 (18):3705-3727
- Qiagen. 2006. *QIAquick Spin Handbook*. Clifton Hill: Qiagen.
- Remm M., Ants K., & Andres M. 2004. Primer Design for Large-Scale Multiplex PCR and Arrayed Primer Extension (APEX) dalam Weissensteiner T., Hugh G.G., & Annette G. (Ed.) *PCR Technology Curren Innovation*. CRC Press, Boca Raton (Hal. 131-140).
- Rosano H.L. & Eduardo A.C. 2014. Recombinant Protein Expression in *Escherichia coli*: advance and challenges. *Frontiers in Microbiology*, 5: 1-17.
- Saiki R.K., David H.G., Susanne S, Stephen J.S, Russel H, Glenn T.H., Kary B.M., and Henry A.E. 1988. *Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase*. *Science*, 239: 487-491.
- Sambrook, J. and Russell, D.W. 2001. *Molecular Cloning A Laboratory Manual*. 3rd Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Shuman S. 1991. Recombination mediated by vaccinia virus DNA topoisomerase

- I in *Escherichia coli* is sequence specific. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 88: 10104-10108.
- Shuman S. 1994. Novel Approach to Molecular Cloning and Polynucleotide Synthesis Using Vaccinia DNA Topoisomerase. *The Journal of Biological Chemistry*, 269 (51): 32678-32684.
- Sanger F, S Nicklen, AR Coulson. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 74: 5463-5467.
- Šnajder M., Mihelič M., Turk D., Ulrih N.P. 2015. Codon Optimisation Is Key for Pernisine Expression in *Escherichia coli*. *PLoS ONE* 10(4): e0123288. doi:10.1371/journal.pone.0123288
- Sorensen H.P. & Mortensen K.K. 2005. Advanced Genetic Strategies for Recombinant Protein Expression in *Escherichia coli*. *Journal of Biotechnology*, 115: 113-128.
- Wang H., Wang F., Wang W., Yao X., Wei D., Cheng H., & Deng Z. 2014. Improving the Expression of Recombinant Proteins in *E. coli* BL21 (DE3) under Acetate Stress: An Alkaline pH Shift Approach. *PLoS ONE* 9(11): e112777. doi:10.1371/journal.pone.0112777
- Weissensteiner T., Hugh G.F., & Annette G. 2004. *PCR Technology Current Innovations*. 2nd.Ed. CRC Press, Boca Raton.
- Zheng Z., Scott S., Lukas W., & Webb M. 2000. A Greedy algorithm for aligning DNA sequences. *J. Comput. Biol.*, 7 (1-2):203-214