

Kloning dan Analisis Bioinformatika Gen MSP1 *Plasmodium falciparum* Isolat Kota Jayapura

ARSYAM MAWARDI^{1*}, LEONARDO E. AISOI², PAULA N. LEFAAN³

¹Jurusan Biologi, FMIPA Universitas Cenderawasih, Jayapura, Papua

²Jurusan Pendidikan Biologi, FKIP Universitas Cenderawasih, Jayapura, Papua

³Jurusan Ilmu Kesehatan Masyarakat, FKM Universitas Cenderawasih, Jayapura, Papua

Diterima: 21 September 2017 – Disetujui: 8 Maret 2018
© 2018 Jurusan Biologi FMIPA Universitas Cenderawasih

ABSTRACT

Cloning gene involves the construction of a recombinant plasmid that inserted in a competent cell. On the other hand, genetic engineering requires bioinformatic analysis to be converted into tabulation and data interpretation. The study, titled "cloning block 2 MSP1 gene of *Plasmodium falciparum* isolate Jayapura city and bioinformatics analysis" is aimed to improve the technique of cloning the MSP1 gene of *P. falciparum*, initiated the creation of DH5 α competent cells, ligations and transformations, plasmid isolation, confirmation the recombinant plasmid and able to perform bioinformatics analysis and construct phylogenetic tree. This study began with the manufacture of *E. coli* DH5 α competent cells, MSP1 gene ligation in pJET1.2/blunt vector and transformation by using the heat shock transformation method, plasmid isolation of alkali lysis method, then plasmid confirmed by PCR and sequencing method, further sequence analysis and phylogenetic tree construction. The results showed that confirmation of MSP1 gene presence in pJET1.2/blunt with PCR was successful. From a total of 4 positive colonies grown in liquid culture, then isolated plasmid and confirmed with PCR obtained electroferogram bands with a size about 1049 bp indicates the presence of MSP1 gene in plasmid. Based on the results, cloning of MSP1 gene using pJET1.2/blunt cloning vector and competent cell *E. coli* DH5 α has been successfully performed. Bioinformatics analysis of sequencing result and phylogenetic tree were constructed successfully with 2 clusters isolate of malaria patients from Jayapura city.

Key words: Bioinformatics, cloning gene, heat shock transformation, MSP1, *P. falciparum*.

PENDAHULUAN

Penyakit malaria merupakan penyakit yang telah menginfeksi manusia hampir merata di seluruh dunia terutama di negara-negara beriklim tropis seperti Asia, Afrika dan Amerika tengah maupun selatan. Menurut *World Health Organization* (WHO) pada tahun 2016 terdapat sebanyak 196-263 juta kasus malaria dan 445 ribu kasus

kematian akibat malaria (WHO, 2017). Hingga kini, telah banyak data penelitian tentang diversitas *Plasmodium falciparum* di Indonesia yang dijadikan sebagai acuan dan pembeda antara kasus pada *P. falciparum* dari suatu gen dengan kombinasi alel yang lainnya, dimana keberadaan alel berperan dalam patogenitasnya (Irawati, 2011; Strom *et al.*, 2013).

Sejalan dengan apa yang dikemukakan oleh Sorontou & Pakpahan (2015) bahwa gen-gen penyandi protein itulah yang menjadi penyebab malaria hampir merata di seluruh dunia terutama di negara-negara beriklim tropis. Lebih jauh, sulitnya penanganan malaria disebabkan karena secara genetik *Plasmodium* dapat bermutasi

* Alamat korespondensi:

PS. Biologi, Jurusan Biologi, FMIPA Uncen. Jl. Kamp.
Wolker, Waena, Jayapura, Papua. Telp./fax.:
+62967572115. e-mail: mawardiarsyam@gmail.com atau
mawardiarsvam@unicen.ac.id

menjadi bentuk strain baru yang lebih resisten terhadap obat malaria. Disamping itu, terbentuknya variasi genetik yang berbeda, menyebabkan kemampuan dalam merespon terjadinya perubahan lingkungan menjadi lebih kuat (Sibley *et al.*, 2011).

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 penampakan dengan induknya ketika gen itu diekspresikan menjadi sebuah protein fungsional. Kloning gen pada intinya mencakup 2 hal yaitu proses ligasi dan transformasi (Koetschan *et al.*, 2014).

Gen-gen *P. falciparum* yang beragam dan diekspresikan sebagai protein-protein permukaan merozoit (MSP) terkhusus MSP-1 adalah suatu bentuk variasi genetik yang terjadi dalam suatu populasi. Ini disebabkan beberapa hal, di antaranya peristiwa mutasi dan rekombinasi (Nurwidayati, 2010). Sementara itu, polimorfisme yang terdapat pada sejumlah gen seperti MSP1 yang mensintesa protein antigen dapat dipakai sebagai marker genetik untuk menentukan perbedaan genetik dari *P. falciparum* (Deborah *et al.*, 2010). Kemajuan pesat dibidang rekayasa genetika dan bioteknologi molekular telah memudahkan identifikasi molekular melalui proses kloning.

Riset ini sangat bermanfaat untuk mengetahui efektivitas pJET1.2/blunt sebagai vektor kloning dan sel kompeten *E. coli* DH5 α sebagai bakteri transforman untuk menstorage gen penyandi *Merozoite Surface Protein 1*. Proses kloning gen MSP1 dapat dilakukan secara tepat, sehingga menyediakan stok gen pengkode MSP-1 yang hasilnya dapat menjadi langkah dasar untuk mendesain dan menganalisis antigen spesifik, maupun menentukan terapi yang mampu mencegah prevalensi penyakit malaria tropika, yang dinilai amat penting dalam upaya penanganan serta pencegahan malaria. Disamping itu, keberhasilan proses kloning dicapai dengan konfirmasi *Polymerase Chain Reaction* (PCR) dan

sekuensing melalui pendekatan bioinformatika yang semakin memvalidasi hasil yang diperoleh.

Penelitian ini bertujuan untuk mengkloning gen MSP-1 *Plasmodium* menggunakan vektor pJET1.2/Blunt dan sel kompeten *E. coli* DH5, menganalisis efektivitas pJET1.2/Blunt sebagai vektor kloning dan sel kompeten *E. coli* DH5 α sebagai bakteri transforman, serta menggunakan pendekatan PCR, sekuensing dan analisis bioinformatika untuk konfirmasi keberhasilan kloning.

METODE PENELITIAN

Pembuatan Sel kompeten *E. coli* DH5 α , proses kloning, serta konfirmasi plasmid dengan PCR dilakukan di laboratorium analisis kromosom dan molekular Institut Teknologi Bandung. Sementara analisis bioinformatika dari hasil konfirmasi metode sekuensing dilakukan di laboratorium bioinformatika ITB. Penelitian dilakukan pada tanggal 15 Juli hingga 10 November 2017.

Tahap persiapan Sampel

Sampel diambil dari hasil purifikasi atau pemurnian ampikon gen MSP1. Gen MSP1 hasil purifikasi yang dipakai untuk setiap sampel sebanyak 50 mikroliter.

Metode Kerja

Pembuatan Sel Kompeten Escherichia coli DH5 α dengan Metode Buffer CCMB

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 ODnya mencapai 0,3-0,4. Sebanyak 12,5 mL *E. coli* DH5 α dengan OD 0,3-0,4 dialiquot ke tabung *falcon* 15 mL steril. Lalu tabung disentrifugasi pada kecepatan 14.000 rpm dengan suhu 4 °C selama 10 menit, supernatan dibuang. Pelet ditambah dengan 4 mL buffer CCMB80 dingin (diresuspensi dengan 2 mL terlebih dahulu, lalu ditambahkan

sisanya. Tips pipet ditempelkan ke tabung *falcon*. Larutan diinkubasi di dalam es selama 20 menit. Lalu disentrifugasi pada kecepatan 14.000 rpm dengan suhu 4 °C selama 10 menit, supernatan dibuang. Pelet diresuspensi dengan 0,6 mL buffer CCMB80 dingin. Selanjutnya larutan diinkubasi di dalam es selama 20 menit. Larutan dialiquot ke dalam *microtube* 1,5 mL @100 µL (*microtube* didinginkan terlebih dahulu). Sel kompeten disimpan pada freezer suhu -80 °C.

Kloning Gen MSP1 dalam Vektor Kloning pJET1.2/Blunt

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

Transformasi dengan Metode Heat Shock Transformation. Sel kompeten *E. coli* DH5α diambil dari tempat penyimpanan suhu -80 °C. Sel kompeten dicairkan dan diinkubasi didalam es selama 10 menit. Selanjutnya plasmid pJET1.2/*blunt* hasil kloning dimasukkan ke dalam tabung *microtube* sebanyak 10 µL yang telah berisi 100 µL sel kompeten. Tabung dijentik beberapa kali kemudian diinkubasi di dalam es selama 30 menit. Tabung diberi kejutan panas dengan cara diinkubasi dalam *water bath* suhu 42 °C selama 90 detik, kemudian diinkubasi kembali di dalam es selama 10 menit. Sebanyak 600 µL SOC ditambahkan kedalam tabung kemudian diinkubasi dan dikocok pada suhu 37 °C selama 2-3 jam dengan kecepatan shaker 250 rpm. Sebanyak 100 µL kultur *E. coli* DH5α hasil transformasi dituang dan disebarkan secara merata di atas permukaan

medium LB padat yang mengandung 100 µg/ml antibiotik ampicilin pada cawan petri menggunakan batang L. Cawan petri diinkubasi pada suhu 37 °C selama 16-18 jam. Lalu diamati.

Isolasi Plasmid pJET1.2/blunt dari E. coli DH5a.

Pre treatment solution. RNAse A solution terlebih dahulu ditambahkan ke *resuspension solution*, lalu dimix hingga larut. *Resuspension solution* yang telah ditambahkan RNAse A disimpan di kulkas 4 °C. Etanol 96 % ditambahkan ke *wash solution* sebelum pertama kali digunakan. Presipitat-presipitat garam yang ada di *lysis solution* dan *neutralization solution* dilarutkan kembali dengan cara memanaskannya di suhu 37 °C, lalu didinginkan kembali di suhu ruang (suhu 25 °C) sebelum digunakan. Botol yang berisi *lysis solution* dicampur dan dihomogenkan secara perlahan.

Prosedur isolasi plasmid. Langkah kerja diawali dengan pemanenan sel. 1,5 mL LB cair hasil kultur cair dimasukkan ke dalam *microtube* 1,5 mL, lalu disentrifugasi pada kecepatan 14000 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 14000 rpm selama 1 menit dan supernatan dibuang. Langkah ini terus dilakukan sampai semua kultur cair habis. Pelet terakhir yang didapatkan kemudian ditambahkan 250 µL *resuspension solution* yang sebelumnya telah ditambahkan RNAse A. Lalu, divorteks hingga semua pelet terlarut. Selanjutnya ditambahkan 250 µL *lysis solution* dan dibolak-balik sebanyak 4-6 kali secara perlahan, sampai *solution* menjadi kental dan terlihat jernih (*microtube* yang telah ditambahkan *lysis solution* tidak divorteks agar DNA kromosomal tidak terpotong-potong atau rusak). Dilanjutkan dengan menambahkan 350 µL *neutralization solution* dan dibolak-balik secara cepat selama 4-6 kali. Kemudian disentrifugasi 14000 rpm selama 5 menit. Semua supernatan yang terbentuk setelah sentrifugasi, dipindahkan ke GeneJET *spin column* yang telah dipasang pada *collection tube* 2 mL. Presipitat putih jangan sampai ikut terambil. Lalu, disentrifugasi 14000 rpm selama 1 menit. Cairan tersisa yang terdapat pada

collection tube dibuang dan GeneJET *spin column* ditempatkan kembali. Kemudian ditambahkan 500 μL *wash solution* yang sebelumnya telah ditambahkan etanol, lalu disentrifugasi 14000 rpm selama 1 menit. Cairan yang tersisa pada *collection tube* dibuang. GeneJET *spin column* kembali ditempatkan pada *collection tube*. Lalu disentrifugasi selama 1 menit 14000 rpm untuk menghilangkan residu dari Wash Solution sebelumnya. GeneJET *spin column* yang telah kering selanjutnya ditempatkan pada *microtube* 1,5 mL baru. Kemudian ditambahkan *elution buffer* 25 μL dan dibiarkan selama 2 menit agar terserap semua pada matriks kolom. Kemudian disentrifugasi 14000 rpm selama 2 menit. Lalu ditambahkan lagi 25 μL *elution buffer*, dibiarkan selama 2 menit dan disentrifugasi selama 2 menit 14000 rpm. Selanjutnya hasil isolasi plasmid langsung dielektroforesis. Volume plasmid yang dimasukkan adalah 5 μL . Selanjutnya diresuspensi dengan 1 μL *loading dye* di atas kertas parafilm. Setelah elektroforesis, hasil isolasi plasmid disimpan di kulkas $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Konfirmasi Plasmid Rekombinan pJET1.2/blunt dengan Metode PCR dan Sekuensing

Konfirmasi Plasmid Rekombinan pJET1.2/blunt dengan Metode PCR. Master mix PCR dibuat untuk 5/6 sampel dalam *microtube* 1,5 ml. Pembuatan dilakukan dalam kondisi dingin. Komposisi *master mix*: air deion 3 μL , *dream taq PCR master mix* 5 μL , primer *forward* 0,5 μL , primer *reverse* 0,5 μL . Pembuatan reaksi PCR untuk MSP1 dengan cara mentransfer *master mix* PCR dan sebanyak 1 μL sampel plasmid pJET1.2/blunt (yang diinsersi dengan gen MSP1) ke dalam tube PCR. Pembuatan dilakukan dalam kondisi dingin. Tube PCR diquick spin. Tube PCR diletakkan dalam *thermocycler machine* dengan kondisi: pradenaturasi suhu $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ selama 3 menit, denaturasi suhu $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ selama 30 detik, *annealing* selama 30 detik dengan suhu *annealing* $55\text{ }^{\circ}\text{C}$, ekstensi suhu $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ selama 2 menit, final ekstensi suhu $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ selama 7 menit. Lalu diamati dengan elektroforesis gel agarosa.

Konfirmasi Plasmid Rekombinan pJET1.2/blunt dengan Metode Sekuensing. Data hasil

sekuensing dianalisis lebih lanjut dengan cara dipotong sekuens DNANYa yang merupakan representasi kromatogram. Sekuens yang dipotong adalah sekuens yang pola grafiknya kurang baik dan tumpang tindih. Pemotongan dan pengeditan dilakukan dengan *software* Bioedit. Setelah itu, Data sekuens *forward* dan *reverse* dilakukan proses *contig*, yang sebelumnya sekuens *reverse* telah diatur menjadi *reverse complement*. Kemudian dilanjutkan dengan analisis *vecscreen* dan analisis blast.

Konstruksi Pohon Filogenetik

Analisis pohon filogenetik dilakukan dengan menggunakan *software* MEGA 6. Pada tahapan ini, sebanyak 5 sekuens dipilih yakni sampel, 10 sekuens yang berkerabat dekat, dan 1 sekuens untuk *outgroup*.

Teknik Pengumpulan Data

Data hasil perlakuan diperoleh dengan banyaknya dengan menggunakan teknis elektroforesis gel agarosa. Untuk mengetahui kuantitas dan kualitas DNA maka dilakukan pengecekan dengan menggunakan agarose 2 %, TAE 1x. Gel agarose dielektroforesis pada tegangan listrik 100 volt selama 25 menit.

Visualisasi dilakukan dengan pendaran cahaya pada UV transiluminator, yang dilengkapi dengan cahaya UV dan divisualisasi dengan kamera sinar ultraviolet pada panjang gelombang 300 nm. DNA memunculkan pendaran akibat ethidium bromida. Dari hasil itu terlihat band atau profil pita yang menunjukkan ukuran basa nukleotida dari gen tersebut.

Hasil kloning gen MSP1 dikirimkan ke *Macrogen Corporation Korea* untuk mendapatkan data hasil sekuensing berupa data kromatogram atau kurva beserta urutan nukleotida.

Analisis Bioinformatika dan Pengolahan Data

Hasil elektroforesis dari amplifikasi, kloning gen MSP1 blok 2, dianalisis dengan melihat ukuran basa nukleotida, dan data sekuens dari *macrogen*. Ukuran basa nukleotida memperlihatkan ukuran spesifik dari gen MSP1. Begitupula dengan data sekuensing diolah dengan beberapa

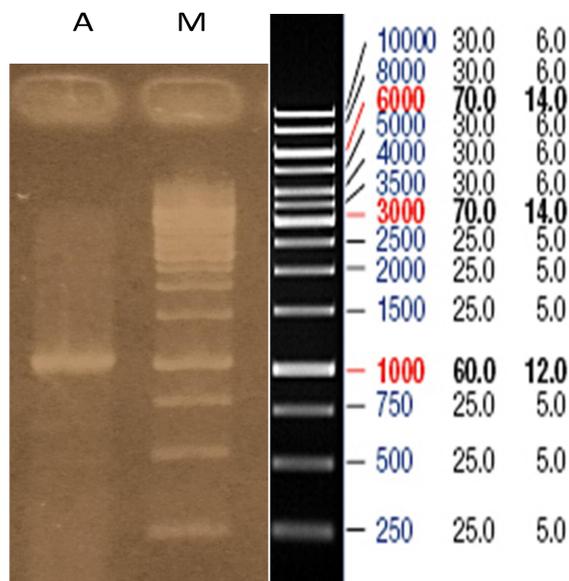
software untuk pendekatan bioinformatika. Data disajikan secara naratif deskriptif.

HASIL DAN PEMBAHASAN

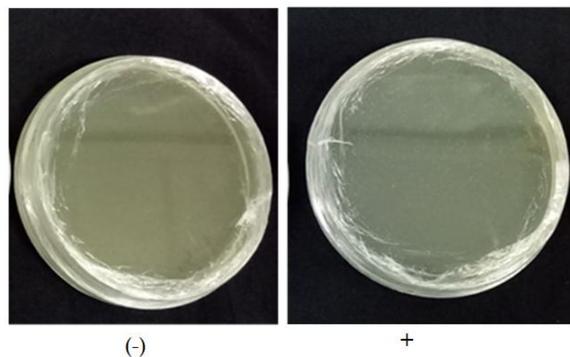
Hasil Purifikasi Produk PCR

Hasil amplifikasi berupa produk PCR, melalui proses purifikasi untuk menghilangkan segala kontaminan dan inhibitor yang masih tersisa. Proses purifikasi amatlah penting karena

keberhasilan kloning juga ditentukan oleh ketepatan dalam melakukan purifikasi hasil PCR. Secara umum, proses purifikasi melibatkan matriks kolom. Produk PCR akan tertarik dari matrix sehingga akan diperoleh larutan yang berisi amplicon yang murni. Untuk mengecek keberhasilan proses purifikasi, dilakukan elektroforesis (Gambar 1). Pola pita yang dihasilkan setelah purifikasi akan terlihat lebih terang dan jernih, serta tidak ada lagi pita *smear*. Sehingga yang terlihat hanya pita tunggal yang berukuran 1049 bp.



Gambar 1. Elektroferogram hasil purifikasi produk PCR. (M= DNA Ladder 1 kb, A= hasil purifikasi, 1049 bp).



Gambar 2. Koloni sel kompeten *E. coli* DH5 α transforman. (-): Kontrol negatif tidak tumbuh koloni bakteri, (+): Media yang ditumbuhi bakteri transforman.

Produk Sel Kompeten *Escherichia coli* DH5 α

Bakteri yang mampu mengambil DNA disebut sel kompeten dan kompetensi sel dapat diinduksi dengan penambahan dengan kalsium klorida pada fase log awal pertumbuhan (Tu *et al.*, 2005). Sel kompeten *E. coli* DH5 α diinkubasi selama 12 jam dalam medium LB cair, dengan acuan bahwa lama waktu tersebut diperkirakan *E. coli* telah mengalami fase log. Fase log diperlukan agar jumlah bakteri yang terisolasi berada pada kondisi optimal (Najia *et al.*, 2010). Penambahan buffer CCMB yang mengandung MgCl₂ berfungsi untuk menurunkan kerapatan membran sel melalui interaksi Mg²⁺ dengan bagian hidrofilik membran (Zhang *et al.*, 2007). Selain itu juga mengandung CaCl₂ yang dapat mempengaruhi 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 (Primrose & Twyman, 2006; Tu *et al.*, 2005). Adapun keseluruhan pengerjaan sel kompeten dilakukan pada suhu dingin bertujuan untuk mempertahankan fungsinya sebagai sel kompeten (Tu *et al.*, 2005; Hwang *et al.*, 2012).

Hasil Ligasi MSP1 ke dalam Vektor Kloning pJET1.2/Blunt

Kloning Gen MSP1 dilakukan dengan menggunakan vektor kloning pJET1.2/blunt. Plasmid ini mempunyai ukuran 2974 bp, blunt end, sistem seleksi menggunakan ampisilin dan sistem *reporter gene* menggunakan gen letal

(eco471R) (Primrose & Twyman, 2006). DNA hasil PCR mempunyai *over hang* karena DNA polymerase yang digunakan adalah *Green Taq DNA polimerase*. Enzim *Green Taq DNA polymerase* menghasilkan produk dengan ujung kohesif 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 juga mempunyai ujung *blunt end*. Selanjutnya DNA hasil PCR diligasikan kedalam pJET1.2/blunt menggunakan enzim *T4 DNA ligase*. *DNA ligase* berfungsi untuk mengkatalis pembentukan ikatan fosfodiester

antara fragmen DNA target dengan fragmen plasmid (Thieman & Michael, 2013).

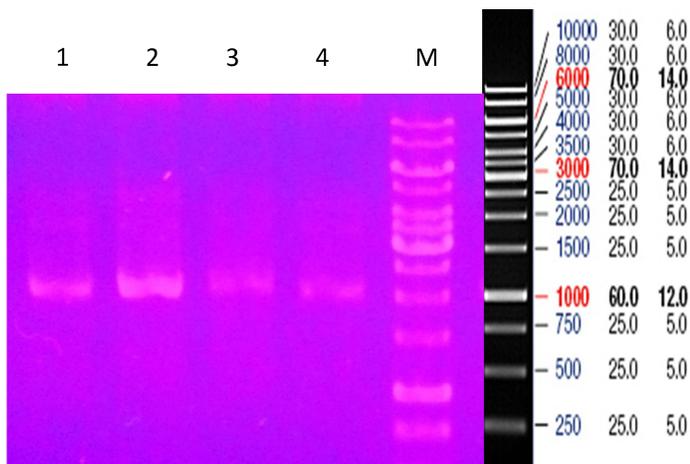
Untuk mengetahui keberhasilan ligasi maka pengamatan dilakukan setelah melakukan transformasi *E. coli* DH5 α dengan plasmid pJET1.2/blunt rekombinan dan dibiakkan dalam media seleksi, sehingga membentuk koloni. Koloni yang dapat tumbuh pada media seleksi ini merupakan salah satu parameter yang menunjukkan bahwa DNA target masuk kedalam pJET1.2/blunt.

Plasmid Transforman

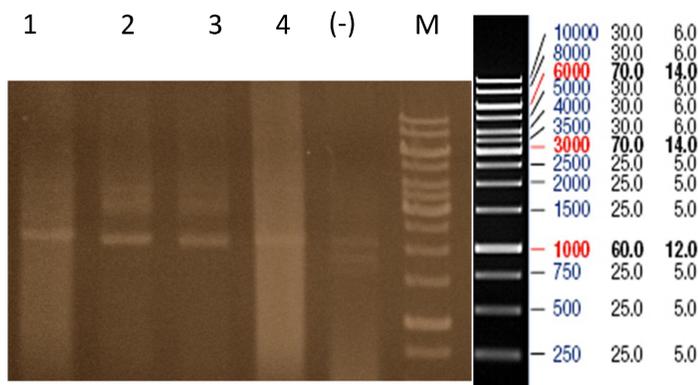
Transformasi merupakan metode penginsersian materi genetik kedalam sel bakteri melalui *direct uptake* dari lingkungan. *Heat shock transformation* adalah metode untuk memasukan plasmid rekombinan ke dalam sel kompeten *E. coli* DH5 α dengan cara memberi kejutan panas (Tu *et al.*, 2005). Pemanasan dilakukan untuk membuat pori sel membuka. Suhu 42 °C digunakan karena *E. coli* masih bisa bertahan pada suhu tersebut, diatas suhu 42 °C kemampuan *E. coli* untuk mengambil DNA menurun bahkan bisa menyebabkan sel *E. coli* mati (Tu *et al.*, 2005).

Untuk mengetahui keberhasilan transformasi maka dilakukan seleksi dengan menumbuhkan kultur *E. coli* hasil transformasi pada medium yang mengandung ampisilin. Dengan adanya ampisilin, maka sel *E. coli* yang dapat tumbuh hanya sel yang mengandung plasmid pJET1.2/blunt karena plasmid ini mempunyai ampisilin resisten.

Proses transformasi berhasil dilakukan (Gambar 2). Hal ini ditandai dengan adanya koloni yang tumbuh sebanyak 29 koloni pada medium LB padat yang mengandung ampisilin dan IPTG. Dengan demikian pembuatan sel kompeten sudah tepat sehingga sel dapat menerima atau mengambil DNA. Proses ligasi pun tepat jadi DNA target dapat diinsersi ke plasmid. Hal ini membuat gen letal (eco417R) tidak terekspresi dan menyebabkan sel hidup. Gen letal terletak pada sekuen *Multi Cloning Site* (MCS) yang terdapat di pJET1.2/blunt, gen letal akan diekspresikan jika tidak ada DNA



Gambar 3. Elektroferogram hasil isolasi plasmid. (M= DNA Ladder 1 kb, 1-4= plasmid).



Gambar 4. Elektroferogram konfirmasi plasmid dengan PCR (L= DNA Ladder 1 kb, 1-18 = plasmid).

target yang masuk di sekuen MCS. Faktor lain yang menjadi kunci keberhasilan transformasi adalah proses *heat shock transformation* yang sudah tepat sehingga plasmid yang sudah diinsersi dengan DNA target masuk kedalam 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 letal tidak terekpresikan dan menyebabkan tumbuhnya koloni berwarna putih.

Isolat Plasmid pJET1.2/blunt dari *E. coli* DH5 α

Isolasi Plasmid bertujuan untuk 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 untuk mengikat kofaktor agar DNA tidak didegradasi oleh DNase, glukosa untuk menjaga tekanan osmosis sel larutan. larutan lisis berfungsi untuk melepaskan plasmid dari sel *E. coli* DH5 α , larutan ini berisi SDS yang berfungsi untuk mengikat membran sel, NaOH berfungsi untuk memecahkan dinding sel dan mendenaturasi DNA untuk memisahkan DNA plasmid dan DNA kromosom. Larutan netralisasi berfungsi untuk menetralkan larutan agar DNA plasmid dapat direnaturasi sehingga DNA plasmid dapat terikat pada membran silika di *spin column* (Birkenmeyer *et al.*, 2010). Larutan pencuci yang mengandung etanol berfungsi untuk mengendapkan DNA plasmid pada membran silika dan menghilangkan garam-garam dan pengotor lainnya. Larutan elusi berfungsi untuk melarutkan DNA plasmid yang terikat pada membran silika (Poh & Gan, 2014; Faatih, 2009).

Berdasarkan hasil elektroforesis pada gambar tiga, isolasi plasmid pJET1.2/blunt yang diinsersi dengan gen MSP1 berhasil dilakukan. Hal ini ditandai dengan adanya pita yang terbentuk. Ukurannya adalah berkisar 1500- 2000 bp, 3000 bp dan 3500 bp. Sehingga diasumsikan DNA plasmid yang ukurannya sekitar 1-3 kb dapat dengan

mudah dibedakan dengan DNA kromosom bakteri yang berkisar 3-5 kb.

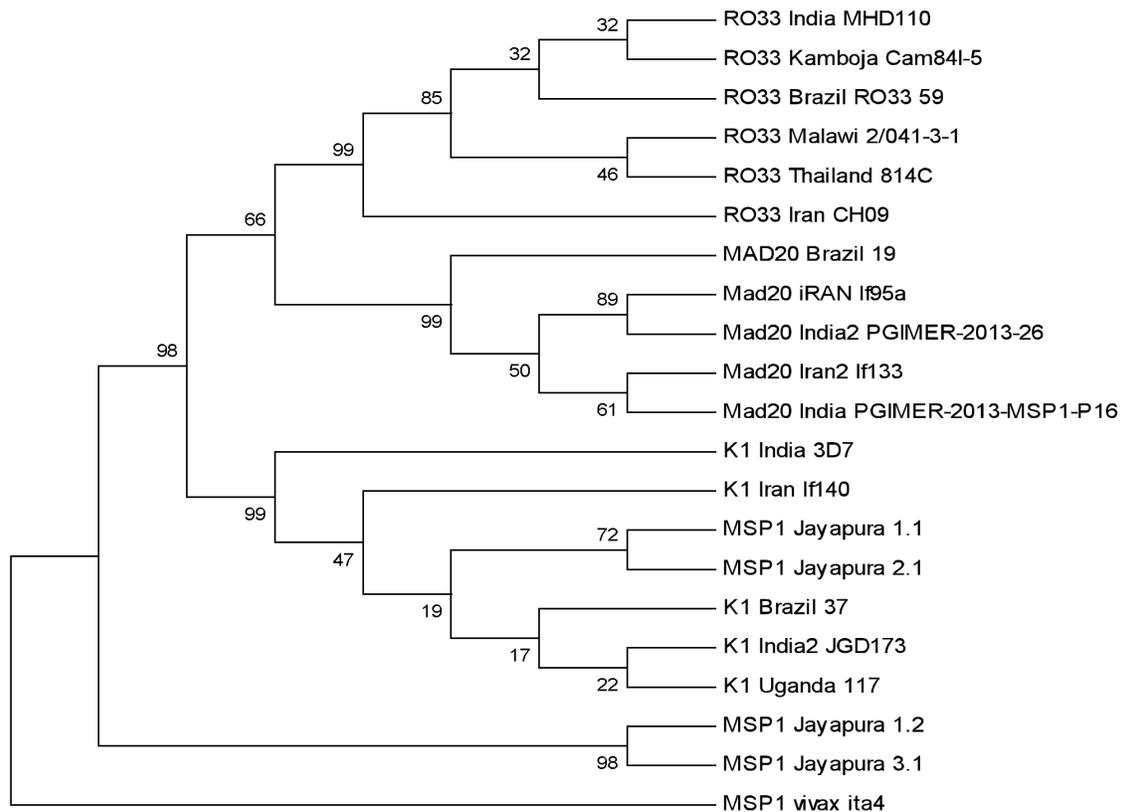
Dari hasil elektroforesis dapat dilihat bahwa pita yang muncul lebih dari satu. Pita-pita tersebut merupakan plasmid dengan konformasi yang berbeda-beda. Konformasi plasmid dapat berupa *covalently closed circular*, *open circular* dan *supercoil*, masing-masing mempunyai kecepatan migrasi yang berbeda (Primrose & Twyman, 2006; Kang *et al.*, 2010). Terlihat ada pita yang terlihat *smear*, hal ini terjadi saat DNA dicuci dengan etanol absolut, pelet terlepas saat pembuangan etanol absolut dan pelet pun ikut terbuang (Mawardi & Simonapendi, 2016). Selain itu, untuk mengetahui keberadaan gen insert didalam plasmid yang sudah diisolasi dapat dikonfirmasi dengan teknik PCR dan sekuensing.

Hasil Konfirmasi Plasmid Rekombinan pJET1.2/blunt dengan Metode PCR dan Sekuensing

Konfirmasi keberadaan gen MSP1 dalam pJET1.2/blunt hasil transformasi dengan PCR berhasil dilakukan (Gambar 4). Hal ini ditandai dengan adanya pita pada hasil elektroforesis dengan ukuran 1600 bp yang menunjukkan gen MSP1. Hal ini juga menunjukkan bahwa gen MSP1 berhasil diinsersi kedalam pJET1.2/blunt.

Konfirmasi yang kedua adalah melalui metode sekuensing. Diperoleh kromatogram hasil pembacaan secara *forward* dan *reverse*. Proses sekuensing dilakukan oleh *Macrogen Corporation*. Dari hasil sekuensing tersebut akan didapatkan kromatogram yang menunjukkan spektrum dan intensitas tertentu. Semakin tinggi konsentrasi plasmid maka spektrum hasil sekuensing akan semakin baik.

Ukuran dari DNA target yang berukuran \pm 1049 bp, sehingga sekuensing dilakukan 2 arah, agar dapat diketahui seluruh urutan nukleotida DNA target. Hasil sekuensing dari tiap reaksi, dilakukan proses *contig* dengan melakukan *reverse complement* terlebih dahulu pada urutan *reverse* yang nantinya akan menghasilkan urutan DNA tanpa celah yang dinamakan daerah *lestari* atau *consensus*. Pengolahan data hasil sekuensing menggunakan *software* BioEdit.



Gambar 5. Konstruksi pohon filogenetik menggunakan metode algoritma *Neighbor Joining*, dengan nilai *bootstrap* 1000.

Hasil Konstruksi Pohon Filogenetik

Konstruksi pohon filogenetik dimaksudkan mengetahui filogeni dan menunjukkan hubungan evolusi antar organisme (hubungan kekerabatan), dimana sampel memiliki sifat yang mirip dengan kerabat terdekat karena sejenis. Untuk melakukan analisis konstruksi pohon filogenetik pada penelitian ini ditentukan *outgroup* yang berada pada level yang berbeda dengan seluruh sekuens yang dibandingkan.

Konstruksi pohon filogenetik diawali dengan proses *alignment* terhadap 12 sekuens menggunakan program ClustalX. Program ini akan melakukan pensejajaran terhadap 12 sekuens. Hasil dari pensejajaran oleh ClustalX kemudian dianalisis untuk mendapatkan konstruksi pohon filogenetik menggunakan program MEGA 6. Hubungan kekerabatan dari sekuens MSP1 *P. falciparum* dan beberapa sekuens yang berkerabat

dekat serta 1 sekuens *outgroup* dapat dilihat dari pohon filogenetik yang terbentuk.

Berdasarkan input data pada program MEGA 6, didapatkan konstruksi pohon filogenetik yang menggambarkan kemiripan antara sesama sampel gen MSP1 Jayapura dengan basis data pada bank gen. Pada gambar 5, Terbentuk 2 kluster besar yaitu MSP1 Jayapura 1.1, MSP1 Jayapura 2.1, dan K1 dari berbagai negara berada dalam satu kluster, sementara MSP1 Jayapura 1.2, dan MSP1 Jayapura 3.1, mengelompok pada kluster yang lain. Terlihat pada gambar 5 bahwa MSP1 Jayapura 1.2, dan MSP1 Jayapura 3.1 terpisah dan memiliki kluster tersendiri di antara isolat yang lain. Hal ini sangat menarik bahwa terdapat kemungkinan dua isolat tersebut memang benar-benar berbeda, memiliki diversitas atau kombinasi alel yang menyebabkan adanya variasi MSP1 pada kedua isolat. Konstruksi pohon

filogenetik juga dimaksudkan untuk mengetahui filogeni dan memperlihatkan hubungan kekerabatan, dimana sampel yang memiliki kemiripan sifat akan berada pada posisi yang berdekatan dalam pohon filogenetik karena memiliki sekuens DNA yang identik atau mempunyai banyak kesamaan. Untuk melakukan analisis konstruksi pohon filogenetik pada penelitian ini, ditentukan *outgroup* yang berada pada level yang berbeda dengan seluruh sekuens yang dibandingkan, yaitu MSP1 vivax ita4, berada pada kluster yang juga berbeda dari 2 kluster sebelumnya, karena MSP1 vivax ita4 telah diposisikan sebagai sampel *outgroup* yang memang berbeda pada tingkat spesies.

Pohon filogenetik tersebut dikonstruksi dengan metode algoritma *Neighbor Joining*, dan nilai *bootstrap* 1000. Adapun angka yang tertera pada pohon filogenetik menunjukkan kredibilitas, konsistensi dan tingkat kekokohan dari pohon tersebut.

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil pengamatan dapat disimpulkan bahwa kloning gen merupakan serangkaian proses menggandakan material genetic agar memiliki sifat yang sama secara hereditas dan fenotip. Kloning gen meliputi: pembuatan sel kompeten, ligasi dan transformasi, pemurnian, dan pengenceran.

Pembuatan sel kompeten dengan metode buffer CCMB berhasil dilakukan. Begitu pula ligasi dan transformasi pJET 1,2/blunt ke dalam *E. coli* DH5 α dengan metode heat shock berhasil dilakukan, dibuktikan dengan tumbuhnya koloni putih pada medium yang telah ditambahkan ampisilin dan IPTG.

Metode alkali lisis efektif dan berhasil dilakukan dalam proses isolasi plasmid pJET 1,2/blunt dari bakteri *Escherichia coli* DH5 α . Konfirmasi plasmid dengan PCR dan sekuensing untuk deteksi MSP1 berhasil dilakukan, terbukti dari pita elektroferogram berukuran 1049 bp, dan sekuens gen MSP1 yang sesuai dengan data bank gen NCBI. Analisis bioinformatika hasil

sekuensing dan konstruksi pohon filogenetik berhasil dilakukan dengan terbentuknya 2 kluster pada isolat pasien malaria yang berasal dari kota Jayapura.

DAFTAR PUSTAKA

- Birkenmeyer, L., M.A. Scott, J.D. George, and M.D. Suresh. 2010. Isolation and characterization of the MSP1 genes from *Plasmodium malariae* and *Plasmodium ovale*. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 82(6): 996-1003.
- Deborah, S., Ken M.H, P.M. Joseph, and A. Salim. 2010. Genetic diversity of *Plasmodium falciparum* strains in children under five years of age in Southeastern Tanzania. *The Open Tropical Medicine Journal*. 3: 10-14.
- Faatih, M. 2009. Isolasi dan digesti DNA kromosom. *Jurnal Penelitian Sains dan Teknologi*. 10(1): 61-67.
- Hwang, J., J. Jaroensuk, M. Leimanis, B. Russell, R. McGready, N. Day, G. Snounou, F. Nosten, and M. Imwong. 2012. Long-term storage limits PCR-based analyses of malaria parasites in archival dried blood spots. *Malaria Journal*. 11(1): 1-7
- Irawati, N. 2011. Genetic polymorphism of merozoite surface protein-1 (*mSP-1*) block 2 allelic types in *Plasmodium falciparum* field isolates from mountain and coastal area in West Sumatera, Indonesia. *Medical Journal Indonesia*. 20: 11-14.
- Kang J.M, S.U. Moon, J.Y. Kim, S.H. Cho, K. Lin, W.M. Sohn, T.S. Kim, and B.K. Na. 2010. Genetic Polymorphism of merozoite surface protein-1 and merozoite surface protein-2 in *Plasmodium falciparum* field isolates from Myanmar. *Malaria Journal*. 9: 131-138.
- Koetschan C., S. Kittelmann, J. Lu, D. Al-Halbouni, G.N. Jarvis, T. Muller, M. Wolf, and P.H. Janssen. 2014. Internal transcribed spacer 1 secondary structure analysis reveals a common core throughout the anaerobic fungi (*Neocallimastigomycota*). *PLoS ONE*. 9(3): e91928.
- Mawardi, A., dan M.L. Simonapendi. 2016. Uji efektivitas metode isolasi DNA genom kopi arabika (*Coffea arabica* L.) asal kabupaten Jayawijaya. *Jurnal Biologi Papua*. 8(1): 7-12
- Nurwidayati, A. 2010. Review artikel: Respon antibodi terhadap protein permukaan merozoite *Plasmodium falciparum* dalam penentuan transmisi malaria. *Jurnal Vektor Penyakit*. 4(1): 17-25.
- Najia, K.G., M. Andreas, U. Johan, J. San, B. Sándor, H. Rabia, and A.B. Mohammad. 2010. Genetic diversity among *Plasmodium falciparum* field isolates in Pakistan measured with PCR genotyping of the merozoite surface protein 1 and 2. *Malaria Journal*. 9: 1-3.
- Poh, J.J., and S.K.E. Gan. 2014. The Determination of factors involved in column based nucleic acid extraction and

- purification. *Journal Bioprocessing and Biotechniques*. 4(3): 157-161.
- Primrose, S.B., and R.M. Twyman. 2006. *Principles of gene manipulation and genomics*. 7th Edition. Blackwell Publishing. Australia.
- Sibley, C.H., , J.E. Hyde, P.F.G. Sims, C.V. Plowe, J.G. Kublin, E.K. Mberu, A.F. Cowman, P.A. Winstanley, W.M. Watkins, and A.M. Nzila. 2001. Pyrimethamine-sulfadoxine resistance in *Plasmodium falciparum*: what next?. *Trends Parasitol*. 17(12): 582-588.
- Sorontou, Y., and A. Pakpahan. 2015. Genetic diversity in MSP-1 gene of *Plasmodium falciparum* and its association with malaria severity, parasite density, and host factors of asymptomatic and smptomatic patients in Papua, Indonesia. *International Journal of Medical Science and Public Health*. 4(11): 1584-1593.
- Strom, G.E., C.G. Haanshuus, M. Fataki, N. Langeland,, and B. Blomberg. 2013. Challenges in diagnosing paediatric malaria in Dar es Salaam, Tanzania. *Malaria Journal*. 12: 228-237.
- Tu, Z., G.He, K.X. Li, M.J. Chen, J. Chang, L. Chen, Q. Yao, Liu, D.P., H. Ye, J. Shi,, and X. Wu. 2005. An improved system for competent cell preparation and high efficiency plasmid transformation using different *Escherichia coli* strains. *Electronic Journal of Biotechnology*. 8(1): 114-120.
- Thieman, W.J., and A.P. Michael. 2013. *Introduction to biotechnology*. USA : Pearson.
- WHO. 2017. *World Malaria Report*. World Health Organization. Geneva.
- Zhang. H., Z. Zhang, J. Li, S. Cai. 2007. Effects of Mg²⁺ on supported bilayer membrane on a glassy carbon electrode during membrane formation. *International Journal of Electrochemical Science*. 2: 788-796.