

# EKSPRESI DAN ISOLASI PROTEIN REKOMBINAN *SURFACE ANTIGEN1* (SAG1) *TOXOPLASMA GONDII* ISOLAT LOKAL PADA *ESCHERICIA COLI* BL21

## AN EXPRESSION AND ISOLATION THE RECOMBINANT *SURFACE ANTIGEN1* (SAG1) PROTEIN OF LOCAL ISOLATE *TOXOPLASMA GONDII* INTO *ESCHERICIA COLI* BL21

Sri Hartati<sup>1</sup>, Asmarani Kusumawati<sup>2</sup>, Hastari Wuryastuti<sup>1</sup>, J. Sri Widada<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Bagian Ilmu Penyakit Dalam dan <sup>2</sup> Bagian Reproduksi, Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Gadjah Mada, <sup>3</sup>Pathogen and Immunity, UMR 5119, CNRS, Universite' Montpellier II, 34095 Montpellier, Cedex 5, France.

\*Contact person E-mail: Toxocat2001@yahoo.com

### ABSTRAK

*Toxoplasma gondii* adalah suatu parasit intraseluler yang dapat menginfeksi bermacam-macam mamalia dan burung. Walaupun infeksi pada manusia yang imunokompeten biasanya asimtomatis, toksoplasmosis masih merupakan problem medis yang serius. Oleh karena itu pengembangan vaksin, termasuk vaksin rekombinan merupakan alternatif yang sangat menarik. Gen SAG1 *mature* dari isolat lokal *T. gondii* sudah berhasil diklonkan dalam plasmid ekspresi prokariot pGEX-2T, dengan tujuan pembuatan antigen SAG1 sebagai kandidat vaksin rekombinan. Penelitian yang dilaporkan disini menyangkut ekspresi SAG1 rekombinan yang berfusi dengan GST (SAG-GST) dalam bakteri *E. coli* BL21 dari plasmid pGEX-SAG. Optimalisasi ekspresi meliputi: konsentrasi IPTG, saat induksi (nilai OD<sub>600nm</sub> kultur) dan lama waktu induksi. Pola protein ekstrak bakteri dianalisa dengan SDS-PAGE. Untuk ekspresi protein rekombinan, dipergunakan isolasi dan purifikasi SAG-GST menggunakan kromatografi afinitas didasarkan pada glutathione-Sepharose (Microspin GST). Analisa protein dengan SDS-PAGE menunjukkan bahwa SAG-GST (56 kDa) diekspresikan dalam bakteri. Dari hasil tersebut dapat disimpulkan bahwa protein rekombinan SAG1 *mature* dapat diproduksi dalam jumlah besar dengan tujuan pemakaiannya sebagai *probe* dalam imunodiagnosa serta sebagai calon vaksin rekombinan.

**Kata kunci:** *T. gondii*, SAG1, PCR, protein rekombinan.

### ABSTRACT

*Toxoplasma gondii* is an intracellular parasite that able to infect a variety of mammals and birds. Although infection of immunocompetent humans is usually asymptomatic, toxoplasmosis still constitutes a serious medical problem. Therefore the development of vaccines including recombinant ones, is an attractive alternative. The gene of the mature SAG1 of a *T. gondii* local isolate has been successfully cloned in the prokaryotic expression plasmid pGEX-2T, with the aim to produce SAG1 antigen as recombinant vaccine candidate. The research work reported here deals with the expression of recombinant SAG1 fused to GST (SAG-GST) in *E. coli* BL21 from pGEX-SAG plasmid. Expression optimization included: IPTG concentration, time of induction (OD<sub>600nm</sub> value of the culture) and induction time length. The protein pattern of the bacterial extract was analyzed by SDS-PAGE. To further determine the expression of the recombinant protein, SAG-GST was isolated and purified using an affinity chromatography based on glutathion-Sepharose (Microspin GST). Protein analysis by SDS-PAGE showed that SAG-GST (56 kDa) was expressed in bacteria. Based on the result can be concluded that the mature recombinant SAG1 can be produced in high amounts, with the aim of its use as probe in immunodiagnosis and as recombinant vaccine candidate.

**Key words:** *T. gondii*, SAG1, PCR, recombinant protein

## PENDAHULUAN

Toksoplasmosis merupakan penyakit infeksi yang saat ini banyak dibicarakan, karena mempunyai dampak yang luas dan menyeluruh. Toksoplasmosis disebabkan oleh *Toxoplasma gondii* dan merupakan suatu zoonosis yang menyerang manusia dan kebanyakan hewan berdarah panas. Penyakit tersebut tersebar luas diseluruh dunia. Diperkirakan  $5 \times 10^8$  orang diseluruh dunia terinfeksi *T. gondii* (Gandahasada, 1995; Denkers dan Gazzinelli, 1998). Pada wanita, toksoplasmosis dapat menyebabkan gangguan kehamilan seperti abortus atau lahir mati. Infeksi primer pada ibu hamil dapat menyebabkan transmisi *T. gondii* ke janin melalui plasenta (Montoya dan Liesenfeld, 2004; Mulyono, 1999). Terjadinya penularan fetomaternal tersebut dapat disebabkan oleh adanya infeksi primer, reinfeksi maupun rekrudesen atau reaktivasi sista *T. gondii* pada ibu yang sedang hamil (Haumont *et al.*, 2000). Toksoplasmosis kongenital terjadi jika ibu hamil belum mempunyai antibodi dalam darahnya dan terinfeksi *T. gondii*. Anak yang dilahirkan dengan toksoplasmosis kongenital dapat mengakibatkan berbagai kelainan misalnya: korioretinitis, retardasi mental, hidrosefalus, mikrosefalus, hepatosplenomegali, ikterus dan lain-lain. Di Indonesia, toksoplasmosis merupakan penyebab kebutaan kedua terbanyak (Budijanto, 1995). Pada hewan, dampaknya mirip pada manusia misalnya kematian embrio dan fetus atau aborsi. Pada hewan tertentu, toksoplasmosis merupakan penyakit berbahaya dan sering berakibat fatal (misalnya pada babi muda dan marsupial Australia). Ensefalitis merupakan manifestasi klinik paling penting pada pasien immunosupresif, dan penyakit ini merupakan penyebab utama kematian pada pasien penderita AIDS (Dubey, 2004).

Pengobatan terhadap penyakit toksoplasmosis sulit dilakukan karena efek toksik dari obat yang tersedia, dan reinfeksi dapat terjadi secara cepat. Oleh karena itu pengembangan vaksin rekombinan merupakan alternatif yang sangat menarik untuk dilakukan.

Penelitian ini difokuskan pada gen SAG1 (*surface antigen 1*), karena pada penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa imunisasi dengan protein SAG1 dapat mencegah toksoplasmosis (Angus *et al.*, 2000). Antigen SAG1, merupakan protein permukaan stadium takizoit, sebagai kandidat yang interesan untuk vaksin rekombinan karena: 1. SAG1 merupakan protein permukaan yang paling dominan dan mempunyai peranan penting dalam perlekatan pada sel inang dan proses infeksi, 2. serum manusia/hewan yang terinfeksi *T. gondii* mengandung antibodi terhadap SAG1, 3. SAG1 mempunyai potensi sebagai vaksin karena dapat menginduksi sintesis antibodi dan menimbulkan proteksi baik humoral maupun seluler, 4. Sekuen gen penyandi SAG1 sudah ditentukan, sehingga dapat dibuat primer untuk amplifikasi *in vitro*, 5. Gen SAG1 tidak mengandung intron sehingga amplifikasi dapat menggunakan matriks DNA genom dengan reaksi PCR atau RNA dengan reaksi RT-PCR (Mineo and Kasper, 1994; Harning *et al.*, 1996; Burg *et al.*, 1998). Hal ini menunjukkan bahwa protein SAG1 merupakan kandidat antigen yang sangat baik. Berdasar pada pertimbangan dampak yang ditimbulkan toksoplasmosis, maka perlu dikembangkan berbagai upaya dan tindakan pencegahan dengan mengembangkan vaksin rekombinan yang aman dan efektif. Pada manusia, perlindungan dengan vaksinasi terhadap toksoplasmosis akan sangat bermanfaat terutama jika diaplikasikan beberapa waktu sebelum atau selama kehamilan untuk mencegah terjadinya reaktivasi maupun infeksi (Debard *et al.*, 1996; Haumont *et al.*, 2000; Velge-Roussel *et al.*, 2000).

Tujuan penelitian ini adalah untuk memproduksi antigen rekombinan SAG1 dalam bakteri *E. coli* BL21 dengan perantara vektor ekspresi prokariot pGEX-2T, sebagai kandidat vaksin terhadap toksoplasmosis.

## MATERI DAN METODE

**Isolasi gen SAG1 *mature* dan kloning dalam plasmid ekspresi pGEX-2T.**

Penelitian ini merupakan kerja lanjutan dari hasil penelitian yang sudah dipublikasikan sebelumnya. Berikut akan diuraikan secara ringkas metodologi yang dipergunakan.

**Isolasi gen SAG1 mature.** Gen SAG1 *mature* diisolasi dengan PCR dari matrik cDNA, menggunakan primer: **ATTAGGATCCATGTTCACTCTCAAGTGC CCT** (*upstream*) (kodon inisiasi tambahan huruf tebal, *site Bam*HI baru digaris bawah; **TTGAGAATTCAGCACAACGGTGATCACT C** (*downstream*) (*site Eco*RI tambahan digaris bawah). Hasil PCR dianalisis dan diisolasi, menggunakan elektroforesis dengan 1% gel agarose (Sri Hartati *et al.*, 2004).

**Kloning dalam pCR2.1-TOPO.** Hasil amplifikasi langsung diklonkan dalam plasmid pCR2.1-TOPO (sistim topoisomerase; kit Invitrogen) kemudian ditransformasikan dalam bakteri *E. coli* DH 5 $\alpha$  kompeten (Sri Hartati *et al.*, 2003)

**Kloning dalam plasmid ekspresi prokariot pGEX-2T.** Konstruksi dalam vektor ekspresi prokariot memungkinkan produksi protein rekombinan berfusi dengan GST (Glutathione-S-transferase), dengan tujuan isolasi dan purifikasi menggunakan kromatografi afinitas. Hasil ligasi selanjutnya ditransformasikan dalam *E. coli* DH 5 $\alpha$  kompeten. Klon positif ditentukan dengan menganalisa plasmid yang dihasilkan dari koloni bakteri dengan pemotongan menggunakan enzim restriksi *Bam*HI dan *Eco*RI (Sri Hartati *et al.*, 2004).

### **Transformasi plasmid pGEX-SAG dalam *E. coli* BL21.**

**Pembuatan bakteri kompeten.** Bakteri *E. coli* BL21 dikultur selama 18 jam, kemudian diambil 0,5 mL lalu dimasukkan pada medium LB baru (40 mL) dan dikultur pada suhu 37°C sampai dengan OD<sub>600nm</sub> mencapai 0,6–0,7 (kira-kira 2–3 jam). Bakteri disentrifus 735 x g, 10 menit, 4°C. Pelet bakteri dari setiap 10 mL kultur dilarutkan dengan 0,5 mL LB dingin kemudian ditambah 0,5 mL TSS 2x (20% PEG 6000, 10% DMSO, 70 mM MgCl dalam media LB).

**Transformasi.** Untuk setiap transformasi diperlukan 10–50 ng plasmid dalam 1–5  $\mu$ L solusi. Plasmid ditambahkan pada 0,2 mL bakteri *E. coli* BL21 kompeten dingin (dalam es). Keduanya diinkubasikan selama sekurang-kurangnya 30 menit dalam es, kemudian *treatment shock thermic* pada suhu 42°C selama 90 detik dan campuran segera dimasukkan ke es kembali selama minimal 2 menit. Kemudian campuran bakteri-plasmid ditambahkan pada 0,5 mL TSS 1x dan diinkubasikan pada suhu 37°C selama  $\geq$  30 menit, lalu 100  $\mu$ L dikultur pada LB plate agar yang mengandung antibiotik ampisilin selama 18 jam pada suhu 37°C (Chung *et al.*, 1989). Sebagai kontrol untuk transformasi, *E. coli* BL21 tanpa *insert* (bakteri kompeten) juga dikultur pada medium LB plate agar yang mengandung ampisilin (100  $\mu$ g/mL) dan tanpa ampisilin kemudian diinkubasi 18 jam pada suhu 37°C.

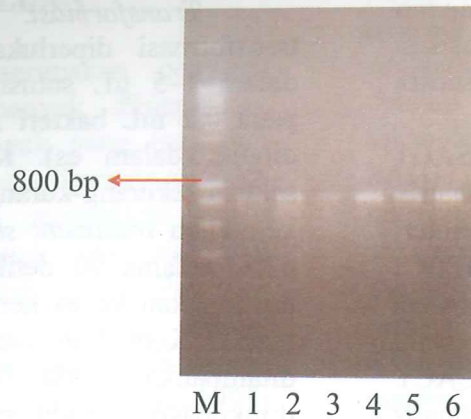
### **Analisis koloni**

Koloni yang tumbuh pada plate agar LB yang mengandung ampisilin diinokulasikan pada medium LB cair mengandung ampisilin kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 18 jam. Plasmid dipurifikasi dengan *High Pure Plasmid Isolation Kit* dan hasil isolasi dilihat pada gel agrarose 0,8%.

### **Uji-pendahuluan ekspresi (*Pilot-expression*) protein SAG1 rekombinan**

Uji pendahuluan ekspresi protein dilaksanakan dalam bakteri *E. coli* BL21, yaitu bakteri yang sesuai untuk ekspresi konstruk dalam pGEX-2T. Protein rekombinan SAG1 (30 kDa) akan disintesis dalam bakteri sebagai protein berfusi dengan GST (26 kDa).

**Kondisi kultur bakteri.** Media kultur yang digunakan adalah 2X YTA (16 g/L tryptone ; 10 g/L yeast ekstrak; 5 g/L NaCl ; pH 7), kemudian ditambahkan ampisilin 100  $\mu$ g/mL kecuali untuk kontrol negatif. Untuk induksi sintesis protein dicobakan konsentrasi akhir IPTG 0,1 mM, 0,5 mM dan 1 mM. Penambahan IPTG dilakukan pada waktu yang berbeda, yaitu pada saat OD<sub>600 nm</sub> kultur mencapai sekitar 0,6, dan 0,8. Suhu inkubasi



Gambar 1. Analisis konstruksi pGEX-SAG dengan PCR. M : DNA Marker (10.000 bp); pita 1-6 : gen SAG1 (800 bp).

kultur yang digunakan adalah 37°C dengan penggojogan keras.

*Ekspresi protein rekombinan.* Starter untuk ekspresi dibuat dengan menginokulasikan klon pGEX-SAG dan klon negatif (kontrol) pada 3 mL media 2X YTA, ditambah ampicillin 100 µg/mL sedangkan untuk kontrol negatif tanpa penambahan ampicilin. Kemudian diinkubasi pada suhu 37°C dengan penggojogan keras selama 18 jam. Dari starter tersebut diambil 1 mL kemudian ditambahkan pada 50 mL media 2X YTA baru yang mengandung ampisilin 100 µg/ml untuk klon positif dan tanpa ampicilin untuk kontrol. Kultur kemudian diinkubasi pada suhu 37°C dengan penggojogan keras. Dilakukan pengambilan sampel setiap jam setelah inokulasi. Penambahan IPTG konsentrasi akhir masing-masing 0,1 ; 0,5 dan 1 mM dilakukan pada saat setelah inkubasi OD<sub>600nm</sub> kultur mencapai 0,8 (sesuai petunjuk perusahaan Amersham Pharmacia). Pengambilan sampel kultur sebanyak 10,5 ml, dengan perincian 0,5 mL untuk pengukuran pertumbuhan (OD<sub>600 nm</sub>) dan 10 mL diambil peletnya dengan sentrifugasi selama 10 menit, 735 x g, pada suhu 4°C, untuk analisa protein dengan SDS-PAGE 10%. Pengambilan sampel dilakukan 3 kali sampai 3 jam setelah dilakukan induksi dengan IPTG.

*Analisis protein dari ekstrak bakteri.*

Pelet bakteri yang didapat dari hasil ekspresi protein kemudian disonikasi dalam 1 mL PBS 1x, kemudian disentrifus pada 735 x g, selama 10 menit pada suhu 4°C. Supernatan yang diperoleh ditambah 4x Laemmli buffer (125 mM Tris-HCl [pH 6,8], 6% sodium dodecyl sulfate [SDS], 0,2% glyserol, 10% 2-mercaptoethanol, 0,03% bromophenol blue), divorteks 30 detik, kemudian dipanaskan pada air mendidih selama 10 menit (Sambrook *et al.*, 1989). Selanjutnya diambil sebanyak 20 µL untuk diloading pada SDS-PAGE (10% acrylamide) dan di elektroforesis.

**Isolasi-Purifikasi SAG1-GST rekombinan dengan Microspin GST**

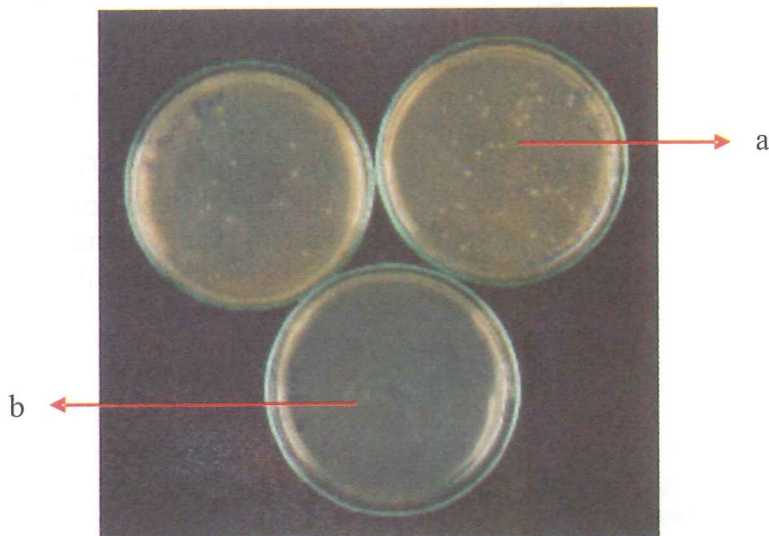
Isolasi-purifikasi SAG1 rekombinan berfusi dengan GST (Glutathione-S-transferase) dilaksanakan dengan kromatografi afinitas menggunakan Microspin GST sesuai dengan petunjuk perusahaan (Amersham Pharmacia). Dibuat 50 mL kultur klon positif, kemudian diinduksi dengan 0,1 mM, 0,5 mM dan 1,0 mM IPTG selama 3 jam, pada suhu 37°C. Untuk preparasi protein rekombinan, tahap-tahap berikut dilaksanakan pada suhu 4°C. Bakteri disentrifus dan pelet dilarutkan dalam 600 µL PBS, lalu disonikasi. Ekstrak bakteri kemudian dituangkan dalam Microspin GST. Microspin dicuci dengan PBS untuk

menyingkirkan semua elemen yang tidak melekat pada glutathione-Sepharose, seperti DNA, RNA dan protein bakteri lainnya. Protein rekombinan berfusi dengan GST lalu di-elusi dengan *reduced* glutathione. Protein dari berbagai tahap dianalisis dengan SDS-PAGE 10%.

### Hasil dan Pembahasan

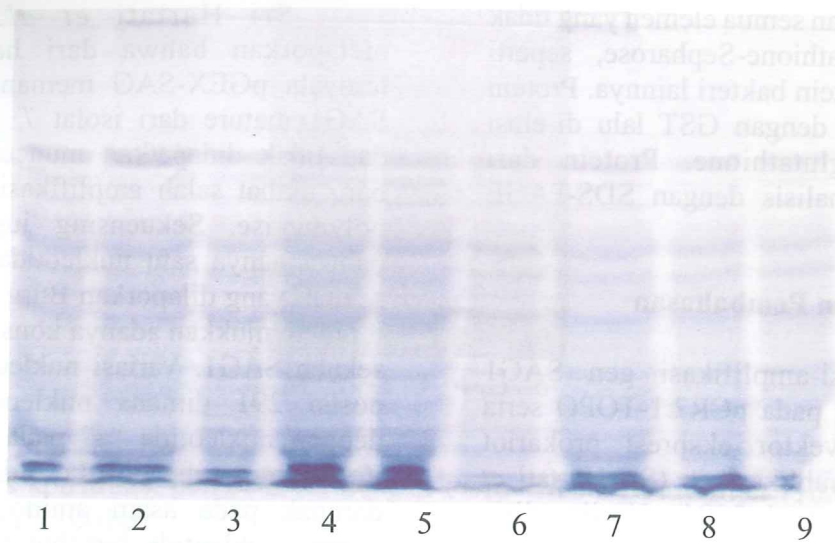
Hasil isolasi-amplifikasi gen SAG1 mature dan kloning pada pCR2.1-TOPO serta subkloning pada vektor ekspresi prokariot pGEX-2T, telah dipublikasikan (Sri Hartati *et al.*, 2003; Sri Hartati *et al.*, 2004). Hasil analisis konstruksii pGEX-SAG dengan PCR menunjukkan efisiensi kloning 100%, dari 6 klon positif semua mengandung gen SAG1 dengan panjang 800 bp (Gambar 1).

Sri Hartati *et al.* (2006) juga melaporkan bahwa dari hasil sekuensing, ternyata pGEX-SAG memang menyandi gen SAG1 mature dari isolat *T. gondii* Indonesia dan tidak didapatkan munculnya kodon stop baru akibat salah amplifikasi oleh enzim Taq polymerase. Sekuensing juga menunjukkan bahwa hanya satu nukleotida berbeda dengan sekuen yang dilaporkan Burg *et al.* (1988). Hal ini menunjukkan adanya konservasi tinggi pada sekuen SAG1. Variasi nukleotida berada pada posisi 291 dimana nukleotida “g” diganti dengan nukleotida “a” pada isolat Indonesia. Perubahan nukleotida tidak memberikan dampak pada asam amino yang dikodekan karena nukleotida tersebut merupakan urutan ketiga dari kodon (“acg” menjadi “aca” dan keduanya mengkode asam amino threonine).



Gambar 2. Transformasi pGEX-SAG pada *E. coli* BL 21

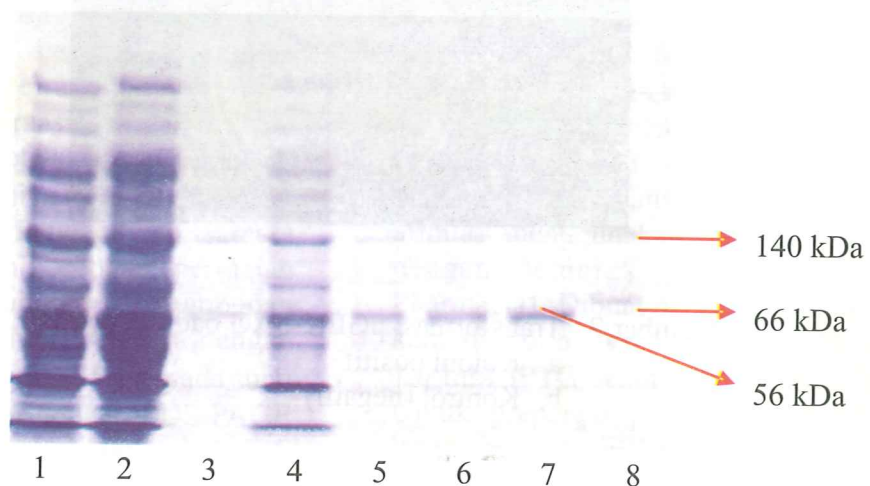
- a. Koloni positif
- b. Kontrol (negatif)



Gambar 3. Profil protein total bakteri rekombinan *E. coli* BL21-SAG hasil ekspresi pendahuluan (*pilot expression*) (pita: 1,2,3,4,5,7,8,9) dan *E.coli* BL21 kontrol (pita 6). Analisis dengan SDS-PAGE 10%.

Gambar 2. menunjukkan hasil transformasi pGEX-SAG dalam *E. coli* BL 21 sesudah penanaman pada media-agar yang mengandung ampisilin dan dikultur 18 jam. Dihasilkan koloni bakteri resisten karena adanya plasmid yang disandi dan memberikan resistensi terhadap antibiotik. Kontrol negatif yaitu bakteri tanpa plasmid dan tidak menghasilkan koloni resisten terhadap ampisilin. Untuk mengetahui apakah protein rekombinan betul diekspresikan dalam bakteri,

dilakukan isolasi dan purifikasi menggunakan kromatografi afinitas. Dalam konstruksi pGEX-2T, protein rekombinan diproduksi *E. coli* sebagai protein berfusi dengan GST (Glutathione-S-transferase). Fusi ini memungkinkan isolasi dan purifikasi protein dengan mudah dengan menggunakan kromatografi afinitas didasarkan pada glutathione-sepharose yaitu Microspin GST. Protein yang menempel dengan perantara GST kemudian dielusi dengan reduced



Gambar 4. Elektroforesis hasil purifikasi protein fusi rekombinan dengan Microspin GST. 1. dan 2. Ekstrak total bakteri ; 4. Flow through ; 3. Elusi protein rek. (induksi 0,1 mM IPTG); 5. elusi prot. Rek. (induksi 0,5 IPTG) ; 6. dan 7. Elusi prot. rek. (induksi 1mM IPTG); 8. Marker protein.(SDS PAGE 10%).

glutathion. Untuk penelitian ini dicoba tiga kondisi yaitu : diinduksi dengan 0,1 mM, 0,5 mM dan 1,0 mM IPTG, sewaktu kultur bakteri rekombinan mencapai OD<sub>600nm</sub> 0,8 pada suhu 37°C dan waktu induksi 3 jam.

Uji pendahuluan ekspresi (*pilot-expression*) diberikan pada Gambar 3. Analisa ekstrak bakteri total yang disonikasi dilakukan dengan SDS-PAGE. Dari pola elektroforetik sulit ditentukan adanya ekspresi protein SAG1 berfusi dengan GST. Dari analisis tersebut tidak kelihatan secara menonjol adanya protein baru dengan berat molekul sekitar 50-56 kDa (30 kDa untuk SAG1 *mature* dan 26 kDa untuk GST). Pola protein ekstrak bakteri terlalu komplek dan jumlahnya terlalu banyak sehingga adanya protein baru dengan pola ekspresi yang tidak terlalu tinggi sulit ditentukan. Ada kemungkinan protein fusi tersebut bermigrasi bersama dengan salah satu protein baku bakteri sehingga keberadaannya tidak terlihat secara jelas.

Hasil analisa protein dari berbagai tahap isolasi-purifikasi dengan SDS-PAGE diperlihatkan pada Gambar 4. Dapat dilihat secara jelas munculnya dua pita protein, masing masing memiliki berat molekul sekitar 56 kDa dan 120 kDa. Berat molekul pita protein sekitar 56 kDa sesuai dengan berat molekul SAG-GST (30 kDa untuk SAG1 *mature* dan 26 kDa untuk GST). Adanya pita protein sekitar 120 kDa diperkirakan protein bakteri *E. coli* BL 21 yang juga mampu berinteraksi dan menempel pada Microspin GST. Namun dibanding dengan pita protein 56 kDa, pita lebih tipis. Kecuali itu pola ekspresi 120 kDa tidak meningkat lebih tinggi dengan konsentrasi IPTG yang lebih tinggi. Berbeda dengan ekspresi protein 56 kDa, ekspresi SAG-GST sudah kelihatan secara jelas ketika bakteri rekombinan diinduksi dengan 0,1 mM IPTG (Gambar 4), kemudian ekspresi naik sekitar 4-5 kali lipat pada konsentrasi IPTG 0,5 mM dan ekspresi paling tinggi dicapai pada konsentrasi IPTG 1,0 mM. Pada konsentrasi tersebut, ekspresi SAG-GST sekitar sepuluh kali lipat dibanding ekspresi pada 0,1 mM IPTG. Dapat disimpulkan bahwa diantara berbagai kondisi ekspresi yang telah dicoba, ekspresi optimum

SAG berfusi dengan GST dicapai jika kultur bakteri rekombinan diinduksi dengan 1,0 mM IPTG sewaktu kultur bakteri mencapai OD<sub>600nm</sub> bernilai 0,8 pada suhu 37°C dan waktu pasca induksi tiga jam.

Penelitian ini menunjukkan secara jelas bahwa protein SAG1 *mature* dapat diproduksi dalam bakteri *E. coli* BL21 dengan perantaraan plasmid ekspresi prokariot pGEX-2T. Dengan demikian protein tersebut (merupakan antigen imunogenik dominan), dapat diproduksi secara lebih mudah, sederhana dan efisien dari pada isolasi dan produksi protein dari parasit. Ditemukan kondisi optimum sintesis SAG1 *mature* berfusi dengan GST (SAG-GST) yaitu: inkubasi goyang bakteri rekombinan pada suhu 37°C, induksi dengan IPTG 1 mM sewaktu kultur bakteri mencapai nilai OD<sub>600nm</sub> 0,8 dan waktu induksi 3 jam. Dari hasil isolasi dan purifikasi protein rekombinan menggunakan Microspin GST dapat disimpulkan adanya ekspresi protein SAG-GST yang cukup tinggi. Isolasi dan purifikasi SAG-GST rekombinan dapat dilaksanakan dengan efisien dengan mutu kemurnian memuaskan, menggunakan kromatografi afinitas yang didasarkan pada glutathione-sepharose. Hasil ekspresi protein rekombinan SAG-GST yang cukup tinggi dan isolasi-purifikasi secara efisien menggunakan kromatografi afinitas, memungkinkan produksi protein rekombinan SAG1 secara besar besaran. Protein rekombinan akan dipergunakan sebagai *probe* untuk serodiagnosa maupun calon vaksin.

#### UCAPAN TERIMAKASIH

Terimakasih disampaikan kepada Direktorat Pembinaan Penelitian dan Pengabdian kepada Masyarakat, Direktorat Jendral Perguruan Tinggi, Departemen Pendidikan Nasional yang telah mendanai penelitian ini melalui Proyek Hibah Bersaing XIII (No. 034/SPPP/PP/DP3M/2005).

#### DAFTAR PUSTAKA

Angus, C. W., Klivington-Evans, D. and Dubey, J. P., 2000. Immunization with

- a DNA Plasmid encoding the SAG1 protein of *Toxoplasma gondii* is immunogenic and protective in rodents. *J. Infect. Dis.* 181: 317–324.
- Budijanto, S.K., 1995. Antibodi Ig A Anti P30 sebagai petanda pada Toksoplasmosis Kongenital dan Akut. *Maj. Kedok. Indon.* Januari 45: 61–65.
- Burg, J.L., Perelman, D., Kasper, L. H., Ware, P. L. and Boothroyd, J. C., 1988. Molecular analysis of the gen encoding the major surface antigens of *Toxoplasma gondii*. *J. Immun.* 141 : 3584–3591.
- Chung, C.T., Niembla, S.L. and Miller, R.H., 1989. One-step preparation of component *Escherichia coli*: transformation and storage of bacterial cells in the some solution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 86: 2172–2175.
- Darcy, F. and Santoro, 1994. Toksoplasmosis dalam Kierszenbaum, F. *Parasitic Infection and The Immune System.*, Academic Press. London. pp. 163–201.
- Debard, N., Buzoni-Gatel, D. and Bout, D., 1996. Intranasal immunization with SAG1 protein of *Toxoplasma gondii* in association with cholera toxin dramatically reduces development of cerebral cysts after oral infection. *Infect. Immun.* 64: 2158–2166.
- Denkers, E.Y. and Gazzinelli, R. T., 1998. Regulation and Function of T-Cell Mediated Immunity During *Toxoplasma gondii* Infection. *Clin. Microbiol. Rev.* 11: 569–588.
- Dubey, J.P., 2004. Toksoplasmosis—a waterborne zoonosis. *Vet. Parasitol.* 126: 57–72.
- Gandahusada, S., 1995. Penanggulangan Toksoplasmosis dalam Meningkatkan Kualitas Sumber Daya Manusia. *Maj. Kedok. Indon.* Juni 6: 365–370.
- Harning, D., Spenter, J., Metsis, A., Vuust, J. & Petersen, E., 1996. Recombinant *Toxoplasma gondii* surface antigen 1 (P30) expressed in *Escherichia coli* is recognized by human *Toxoplasma*-specific immunoglobulin (IgM) and IgG antibodies. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 3:355–357.
- Haumont, M., Delhay, L., Garcia, L., Jurado, M., Mazzu, P., Daminet, V. Verlant, V., Bollen, A., Biemans, R. and Jacquet, A., 2000. Prospective immunity against congenital toxoplasmosis with recombinant SAG1 protein in a guinea pig model. *Infect. Immun.* 68: 4948–4953.
- Mineo, J.R. and Kasper, L. H., 1994. Attachment of *Toxoplasma gondii* to host cells in involves major protein SAG1 (P30). *Exp. Parasitol.* 79: 11–20.
- Montoya, J. G. and Liesenfeld, O., 2004. Toksoplasmosis. *The Lancet.* 263: 1965–1975.
- Mulyono, R., 1999. Perkembangan diagnosis toksoplasmosis. *Maj. Kedok. Indon.* Juni 49: 197–198.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T., 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual.* 2<sup>nd</sup> ed. Cold Spring Harbour Laboratory Press. New York.
- Sri Hartati, Sri Widada, Sumartono, Asmarani Kusumawati, 2003. Cloning of the gene encoding SAG1 of local isolate *Toxoplasma gondii* in *Escherichia coli* DH5a. *J. Sain Vet.*, XXI (2): 51–56.
- Sri Hartati, Hastari Wuryastuti, Sri Widada, Sumartono dan Asmarani Kusumawati, 2004. Kloning dan ekspresi gen penyandi SAG1 *Toxoplasma gondii*



isolat lokal pada vektor pGEX-2T. *J. Sain Vet.* XXII (2): 19–22.

Sri Hartati, Asmarani Kusumawati, Hastari Wuryastuti and Sri Widada, 2006. Primary Structure of Mature SAG1 gene of an Indonesian *Toxoplasma gondii* and Comparison with other Strain. *J. Vet Sci.* 7 (3): 263–270.

Velge-Roussel, F., Marcelo, P., Lepage, A. C., Buzoni-Gatel, D. and Bout, D. T., 2000. Intranasal immunization with *Toxoplasma gondii* SAG1 induces protective cell into both NALT and GALT compartments. *Infect. Immun.* 68: 969–972.