

Kloning Gen Melanoma Antigen 1 (*Mage-1*) dari Jaringan Testis untuk Mendapatkan Plasmid Rekombinan *Mage-1*

Gondo Mastutik,¹ Reny I'tishom,² Sunaryo Hardjowijoto,³ Suhartono Taat Putra¹

¹Departemen Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga, ²Departemen Biologi Kedokteran Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga, ³Departemen Urologi Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga

Abstrak

Gen Melanoma antigen-1 (*Mage-1*) diekspresikan oleh sel spermatogonia jaringan testis normal dan diekspresikan 60–80% oleh liver penderita karsinoma hepatoseluler (KH). Ekspresi *Mage-1* merupakan penanda untuk diagnosis KH serta prediktor kanker lambung dan kolorektal. Isolasi messenger ribonucleid acid (mRNA) *Mage-1* dari jaringan liver penderita KH sulit dilakukan sehingga dilakukan isolasi mRNA *Mage-1* dari jaringan yang mengekspresikan *Mage-1*, yaitu jaringan testis normal. Penelitian ini merupakan penelitian eksploratif yang dilakukan di Lembaga Penyakit Tropis Universitas Airlangga, Agustus 2006–Agustus 2008. Tujuan untuk mengkloning seluruh area koding gen *Mage-1* dari jaringan testis pada vektor dan mendapatkan plasmid rekombinan *Mage-1*. Isolasi seluruh area koding gen *Mage-1* dilakukan dengan teknik *semi-nested polymerase chain reaction* (PCR). Seluruh area koding gen *Mage-1* diisolasi, kemudian dikloning ke plasmid pET101/D-TOPO dan ditransformasikan ke *Escherichia coli* (*E. coli*) Top10 untuk mendapatkan plasmid rekombinan *Mage-1*. Panjang pET101/D-TOPO adalah 5.753 bp dan area koding gen penyandi *Mage-1* 927 bp sehingga total panjang plasmid rekombinan 6.680 bp (5.753+927). Hasil analisis restriksi dengan EcoRV menunjukkan pita 4.230 dan 2.450 (4.230+2.450=6.680). Analisis sekuens gen *Mage-1* dari testis mempunyai homologi 100% dengan sekuens M77481 serta NM_004988, dan 99% dengan BC01755. Simpulan, berdasarkan hasil analisis restriksi dan sekuens maka diperoleh plasmid rekombinan pETGM/MAGE1-Testis yang mengandung seluruh area koding gen *Mage-1* dan dapat digunakan untuk pengembangan kit diagnostik karsinoma hepatoseluler. [MKB. 2015;47(4):199–206]

Kata kunci: Jaringan testis, karsinoma hepatoseluler, kloning, melanoma antigen-1, pET101/D-TOPO

Cloning of Melanoma Antigen 1 (*Mage-1*) Gene from Testicular Tissue to Obtain the Recombinant Plasmid *Mage-1*

Abstract

Melanoma antigen-1 (*Mage-1*) is expressed by spermatogonia cells of normal testicular tissue and 60–80% is expressed by the liver of hepatocellular carcinoma (HC) patients. *Mage-1* expression is a marker for diagnosing HC and predicting gastric and colorectal cancers. Isolation of messenger ribonucleid acid (mRNA) *Mage-1* from the liver tissue of HC patients is difficult; therefore, *Mage-1* mRNA isolates can be obtained from tissues that express *Mage-1* such as normal testicular tissues. This is an explorative research that was conducted at the Institute of Tropical Diseases of Airlangga University during August 2006–August 2008. The aim was to clone the coding sequence of *Mage-1* gene from testicular tissues into a vector and to get recombinant plasmid *Mage-1*. Isolation of the full-length *Mage-1* was performed using semi-nested polymerase chain reaction (PCR) which was then cloned into plasmid pET101/D-TOPO and transformed into *Escherichia coli* (*E. coli*) Top10 to get recombinant plasmid *Mage-1*. The length of pET101/D-TOPO was 5,753 bp and *Mage-1* was 927 bp. The length of recombinant plasmid was 6,680 bp (5,753+927). Restriction analysis using EcoRV showed 4,230 and 2,450 bp bands (4,230+2,450=6,680). Sequence analyses showed that *Mage-1* was 100% homologous with M77481 and NM_004988, 99% homologous with BC01755. In conclusion, according to the results of the restriction and sequences analysis, the recombinant plasmid pETGM/MAGE1-Testis contains the full length coding region of *Mage-1* and is useful for developing the hepatocellular carcinoma diagnostic kits. [MKB. 2015;47(4):199–206]

Key words: Cloning, hepatocellular carcinoma, melanoma antigen-1, pET101/D-TOPO, testicular tissue

Korespondensi: Dr. Gondo Mastutik drh., M.Kes, Departemen Patologi Anatomi, Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga, Jalan Prof. Dr. Moestopo No. 47 Surabaya 60131, Telepon (031) 5020251 ext 151, Fax. (031) 5026333, *mobile* 081231071818, *e-mail* gondomastutik@gmail.com

Pendahuluan

Gen melanoma antigen (*Mage*) termasuk gen kanker testis dan diberi nama demikian karena hanya diekspresikan pada sel kanker dan testis normal sehingga disebut juga dengan istilah gen kanker-testis untuk gen pengkode dan antigen kanker-testis untuk antigen. Gen ini pertama kali diisolasi dari jaringan kulit penderita melanoma dan kemudian dikenal sebagai gen *Mage*. Gen *Mage-1* (disebut juga gen *Mage-A*) termasuk antigen kanker yang dikode oleh keluarga gen *Mage*. Gen *Mage-1* terletak di kromosom Xq28 dan diekspresikan pada sel spermatogonia di jaringan testis normal.^{1,2} Gen *Mage-1* tersebut diekspresikan terhadap jaringan liver penderita karsinoma hepatoseluler (KH) ukurannya <2 cm, pada kadar *alpha feto protein* (AFP) normal atau abnormal, dan tidak diekspresikan pada jaringan liver nontumor dan juga jaringan liver yang terinfeksi virus hepatitis. Ekspresi *Mage-1* pada jaringan liver penderita KH berhubungan dengan penyimpangan hipometilasi genom termasuk pada *domain promoter Mage-1*³ sudah terjadi sejak awal transformasi malignan dan juga terus berlanjut selama progresi menjadi karsinoma hepatoseluler⁴ sehingga ekspresi *messenger ribonucleid acid* (mRNA) atau protein *Mage-1* pada jaringan liver penderita (KH) menunjukkan transformasi sel ke arah keganasan.

Ekspresi gen *Mage-1* merupakan penanda untuk diagnosis KH⁵ dan untuk memprediksi terdapat kanker lambung dan kolorektal.⁶ Hal tersebut memperlihatkan bahwa protein *Mage-1* tersebut dapat dipergunakan sebagai biomaterial sebagai pengembangan diagnosis karsinoma hepatoseluler. Isolasi mRNA *Mage-1* dari jaringan liver penderita karsinoma hepatoseluler sulit dilakukan. Biopsi terbuka dan reseksi jaringan liver pada penderita karsinoma hepatoseluler jarang sekali dilakukan karena risiko perdarahan yang sulit dikendalikan sehingga sulit untuk melakukan isolasi mRNA *Mage-1* jaringan kanker. Pengambilan jaringan dengan teknik *fine needle aspiration biopsy* (FNAB) ini mempergunakan jarum berukuran kecil (22G atau 24G) yang dipandu dengan tuntunan *computer tomography scan* (CT-scan). Namun, karena jumlah sel yang dapat diaspirasi dengan teknik FNAB sangat sedikit sehingga isolasi mRNA *Mage-1* dari hasil FNAB jaringan liver pada penderita KH juga sulit untuk dilakukan. Selain itu, penanganan sampel *ribonucleid acid* (RNA) lebih sulit dilakukan karena RNA mudah didegradasi oleh RNAase. Oleh karena itu, perlu dilakukan isolasi mRNA *Mage-1* dari sampel mengekspresikan *Mage-1*,

yaitu jaringan testis normal.

Penelitian ini adalah penelitian eksploratif yang bertujuan mengkloning area koding gen *Mage-1* dari jaringan testis pada vektor serta untuk mendapatkan plamid rekombinan *Mage-1*.

Metode

Penelitian ini merupakan penelitian eksploratif laboratorium yang dilaksanakan di Lembaga Penyakit Tropis Universitas Airlangga pada bulan Agustus 2006–Agustus 2008. Sampel diperoleh dari jaringan testis penderita kanker prostat yang berusia >70 tahun dan yang mendapatkan terapi orkidektomi. Sebelum dilakukan isolasi seluruh area koding gen *Mage-1*, terlebih dahulu dilakukan identifikasi mRNA *Mage-1* memakai metode yang sudah dilaporkan sebelumnya.⁷ Primer yang dipergunakan untuk identifikasi meliputi area *exon 1*, *exon 2*, dan sebagian *exon 3* karena area ini merupakan area yang paling *conserve* untuk gen *Mage-1*.

Isolasi pada seluruh area koding gen *Mage-1* dilakukan dengan teknik *semi nested polymerase chain reaction* (PCR).⁸ Hasil PCR yang pertama, yaitu meliputi area gen *Mage-1 exon 1, 2, dan 3* dengan total produk 1.105 bp, lalu dilakukan PCR kedua dengan menggunakan *template* hasil PCR pertama. Hasil yang diperoleh dari PCR kedua ini, yaitu seluruh area koding gen *Mage-1* yang terletak pada *exon 3* dengan produk sekitar 931 bp. Plasmid yang dipergunakan yaitu pET101/D-TOPO. Hasil yang diharapkan dari penelitian ini, yaitu mendapatkan plasmid rekombinan *Mage-1*. Primer yang dipergunakan untuk mengisolasi pada seluruh area koding gen *Mage-1* adalah GMTPOF CACCATGTCTCTTGAGCAGAGGAGTC dan GMTPOPOR GCTTTGAGAG AGGAGGAAGAGGGAGTC yang menghasilkan 931bp. Kondisi PCR, yaitu *predenaturation* pada 95°C selama 5 menit, *denaturation* pada 95°C selama 1 menit, *annealing* pada 60°C 1 menit, *extension* pada 72°C 1 menit, 35 siklus dan *final extension* pada 72°C selama 10 menit. Hasil PCR itu dianalisis dengan gel elektroforesis pada gel agarose 2% yang mengandung *ethidium bromide*, setelah itu divisualisasikan mempergunakan ultraviolet (UV) transluminator. Produk PCR kemudian dipurifikasi untuk persiapan kloning.

Hasil purifikasi produk PCR dikloning pada vektor ekspresi pET 101/D-TOPO yang memiliki penanda histidin untuk memudahkan purifikasi protein rekombinan. Campuran reaksi, yaitu 1 µL bufer, 1,5 µL produk PCR, dan 0,5 µL vektor yang dicampur dengan pipet. Total volume 3 µL.

Campuran reaksi diinkubasi dalam es selama 5 menit, kemudian langsung ditransformasikan ke *Escherichia coli* (*E. coli*) *Top10*.

E. coli Top10 disiapkan sebagai sel kompeten dengan memakai kalsium klorida (CaCl_2). Vektor yang mengandung *deoxyribonucleic acid* (DNA) target hasil kloning ditransformasi ke *E. coli Top10* dengan cara mencampurkan campuran reaksi hasil kloning dengan 200 μL sel kompeten *E. coli Top10* secara hati-hati dan juga dibiarkan dalam es selama 30 menit, kemudian dilakukan *heat shock*. Tube yang berisi hasil kloning dan sel kompeten dimasukkan ke dalam *water bath* 42°C selama 45 detik, kemudian direndam dalam es selama 5 menit. Setelah itu ditambahkan 100 μL media *super optimal catabolite* (SOC) suhu kamar dan diinkubasi selama 60 menit pada *water bath* suhu 37°C, kemudian disebar pada media *luria broth* (LB) padat yang mengandung 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ampisilin dan selanjutnya dikultivikasi dalam inkubator suhu 37°C selama 16 jam.

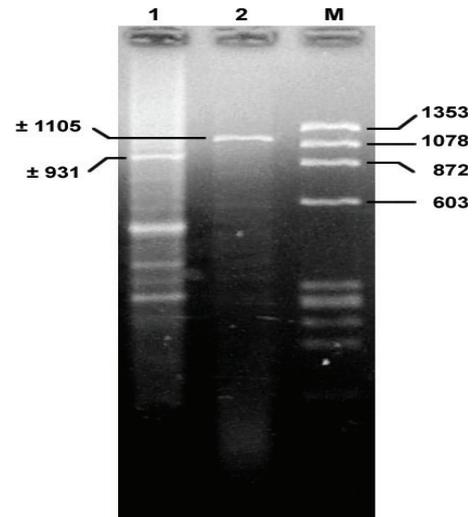
Sel transforman yang mengandung DNA target diinokulasi pada 10 mL media LB cair yang mengandung ampisilin 100 mg/mL. Kultur diinokulasi semalam (*overnight*) dalam *shaker incubator* pada 37°C dengan *shaker* 200 rpm. Isolasi plasmid dilakukan dari hasil kultivikasi memakai *high speed plasmid mini kit* (Geneaid) seperti petunjuk buku manual.

Analisis plasmid rekombinan pETGM/*Mage-1*-testis dilakukan dengan cara analisis sekuens nukleotida dari DNA target yang terdapat pada plasmid untuk mengetahui keberhasilan kloning. Analisis ini meliputi uji restriksi dengan enzim restriksi dan sekuensing untuk uji homologi.

Hasil

Isolasi seluruh area koding gen *Mage-1* dilakukan dengan teknik *semi nested* PCR. Primer yang dipergunakan untuk mengisolasi seluruh area koding gen *Mage-1*, yaitu GMTOPOF CACCATGTCTCTTGAGCAGAGGAGTC dan juga GMTOPOR GCTTTGAGAGAGGAGGAAGA-GGGAGTC yang menghasilkan produk sekitar 931 bp (Gambar 1).

Produk PCR dipurifikasi terlebih dahulu untuk persiapan kloning dan sekuensing. Purifikasi ini dilakukan untuk menghilangkan sisa primer dan pengotor lain seperti garam, sisa enzim, agarosa, pewarna, *ethidium bromida*, *mineral oil*, dan juga deterjen yang tidak terikat pada membran silika gel. Penambahan bufer PE yang mengandung etanol membuat pengotor akan mengalir keluar dari matriks kolom melalui tahapan sentrifugasi



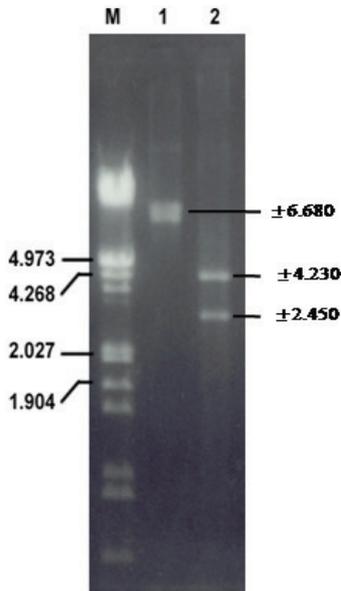
Gambar 1 Hasil Elektroforesis Produk PCR dengan Primer GMTOPOF dan GMTOPOR dari Sampel Jaringan Testis Normal.⁸ 1=produk PCR second round ($\pm 931\text{bp}$), 2=produk PCR first round ($\pm 1.105\text{ bp}$), M=Marker 1x 174 RF DNA /Hae III fragments

dan tidak terikat pada membran silika. Produk PCR yang terikat pada membran elusi dengan penambahan bufer elusi. Hasil elusi tersebut siap digunakan untuk sekuensing dan kloning.

Produk PCR atau DNA target yang sudah dipurifikasi kemudian diinsersikan ke plasmid. Plasmid yang dipergunakan, yaitu pET101/D-TOPO secara langsung tanpa melalui restriksi karena vektor sudah didesain ialah untuk *direct cloning*. Hasil insersi itu ditransformasikan ke dalam *E. coli Top10*, kemudian dikulturkan pada media LB mengandung ampisilin (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$).



Gambar 2 Hasil Kultivasi Sel Transforman *E. coli Top10* yang Mengandung Plasmid Rekombinan



Gambar 3 Hasil Restriksi Plasmid Rekombinan Menggunakan *EcoRV* dari Sel Transforman *E. coli Top10*. M=marker DNA λ yang dipotong dengan enzim *HindIII* dan *EcoRI*, 1=plasmid rekombinan, 2=hasil restriksi plasmid rekombinan dengan *EcoRV*

E. coli Top10 merupakan mikroorganisme yang sensitif terhadap antibiotik sehingga *E. coli Top10* yang dapat tumbuh dalam media tersebut adalah sel transforman *E. coli Top10* yang telah mengandung plasmid rekombinan (Gambar 2). Analisis plasmid rekombinan itu dilakukan

mempergunakan analisis restriksi *EcoRV* dan analisis sekuens nukleotida. Analisis restriksi menggunakan enzim *EcoRV* dilakukan dari hasil isolasi plasmid rekombinan yang ditransformasi ke sel kompeten *E. coli Top10* dan dikultivikasi pada media LB cair yang mengandung ampisilin. Hasil restriksi plasmid rekombinan kemudian dielektroforesis dan divisualisasikan dengan UV transluminator (Gambar 3).

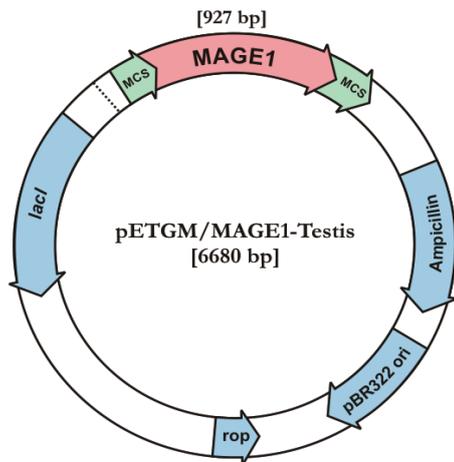
Sekuensing plasmid rekombinan penelitian ini mempergunakan DNA sequencer ABI PRISM 310 dengan mempergunakan *big dye terminator sequencing kit* (*Applied biosystems*). Primer yang dipergunakan adalah *primer forward* T7 5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3' dan juga *primer reverse* 5'-TAGTTATTGCTCA GCGGTGG-3'. Analisis sekuens gen *Mage-1* dari testis memiliki homologi 100% dengan sekuens M77481 dan NM_004988, dan 99% dengan BC01755.⁸ Hasil sekuensing menunjukkan bahwa gen penyandi *Mage-1* dari jaringan testis normal terdiri atas 927 nukleotida yang mengkode 309 asam amino termasuk *start codon* (Gambar 4).

Berdasarkan hasil analisis restriksi dan juga sekuensing maka diperoleh plasmid rekombinan yang mengandung seluruh wilayah koding gen *Mage-1*. Plasmid rekombinan tersebut diberi nama sesuai dengan nama plasmid yang dipakai, nama peneliti, dan nama gen, serta asal sampel. Plasmid yang digunakan, yaitu pET101/D-TOPO, oleh peneliti Gondo Mastutik, gen *Mage-1*, dan sampel itu berasal dari jaringan testis normal sehingga plasmid rekombinan yang dihasilkan pada penelitian disebut pETGM/*Mage1*-testis (Gambar 5).

```

1  ATGTCTCTTG AGCAGAGGAG TCTGCACTGC AAGCCTGAGG AAGCCCTTGA GGCCCAACAA
61  GAGGCCCTGG GCCTGGTGTG TGTGCAGGCT GCCACCTCCT CCTCCTCTCC TCTGGTCTTG
121 GGCACCCTGG AGGAGGTGCC CACTGCTGGG TCAACAGATC CTCCCAGAG TCCTCAGGGA
181 GCCTCCGCCT TTCCCACTAC CATCAACTTC ACTCGACAGA GGCAACCCAG TGAGGGTTCC
241 AGCAGCCGTG AAGAGGAGGG GCCAAGCACC TCTTGATATCC TGGAGTCTTT GTTCCGAGCA
301 GTAATCACTA AGAAGGTGGC TGATTTGGTT GGTTTTCTGC TCCTCAAATA TCGAGCCAGG
361 GAGCCAGTCA CAAAGGCAGA AATGCTGGAG AGTGTATCA AAAATTACAA GCACTGTTTT
421 CCTGAGATCT TCGGCAAAGC CTCTGAGTCC TTGCAGCTGG TCTTTGGCAT TGACGTGAAG
481 GAAGCAGACC CCACCGGCCA CTCCTATGTC CTTGTCACCT GCCTAGGTCT CTCCTATGAT
541 GGCCTGCTGG GTGATAATCA GATCATGCCC AAGACAGGCT TCCTGATAAT TGTCCTGGTC
601 ATGATTGCAA TGGAGGGCGG CCATGCTCCT GAGGAGGAAA TCTGGGAGGA GCTGAGTGTG
661 ATGGAGGTGT ATGATGGGAG GGAGCACAGT GCCTATGGGG AGCCCAGGAA GCTGCTCACC
721 CAAGATTTGG TGCAGGAAAA GTACCTGGAG TACCGGCAGG TGCCGGACAG TGATCCCGCA
781 CGCTATGAGT TCCTGTGGGG TCCAAGGGCC CTCGCTGAAA CCAGCTATGT GAAAGTCTTT
841 GAGTATGTGA TCAAGGTCAG TGCAAGAGTT CGTTTTTCT TCCCATCCCT GCGTGAAGCA
901 GCTTTGAGAG AGGAGGAAGA GGGAGTC
    
```

Gambar 4 Hasil Sekuensing Plasmid Rekombinan dari Sampel Jaringan Testis Normal dengan Menggunakan Primer Froward T7 dan Primer Reverse T7



Gambar 5 Peta Plasmid Rekombinan pETGM/MAGE1-Testis dari Jaringan Testis Normal

Pembahasan

Penelitian ini merupakan penelitian eksploratif yang memiliki tujuan mengkloning area koding gen *Mage-1* dari jaringan testis pada vektor dan untuk mendapatkan plasmid rekombinan *Mage-1*. Isolasi seluruh area koding gen *Mage-1* dilakukan dengan teknik *semi nested* PCR. Plasmid yang digunakan, yaitu pET101/D-TOPO. Hasil yang diharapkan dari penelitian ini untuk mendapatkan plasmid rekombinan *Mage-1*.

Primer yang dipergunakan dirancang agar mampu mengamplifikasi seluruh area koding gen penyandi *Mage-1* yang disesuaikan dengan plasmid pET101/D-TOPO yang dipergunakan untuk kloning. *Primer forward* ditambah empat nukleotida (CACC) pada ujung 5' sebelum *start codon* (ATG) sebagai tempat perlekatan dengan plasmid yang memiliki *overhang* GTGG (komplemen CACC). *Primer reverse* tidak boleh mengandung sekuens *stop codon* (TAA, TGA, TAG) agar plasmid rekombinan yang dihasilkan mempunyai *histaq* yang berguna dalam proses purifikasi protein.⁹ *Stop codon* gen *Mage-1*, yaitu TGA sehingga sekuens TGA harus dihilangkan dari sekuens *primer reverse*. Sekuens *primer reverse* didesain agar mampu menempel pada kodon kedua terakhir sebelum TGA karena *stop codon* yang dipakai adalah *stop codon* vektor.

Hasil PCR yang pertama meliputi area gen *Mage 1 exon 1, 2, dan 3* dengan total produk 1.105 bp, kemudian dilakukan PCR kedua dengan mempergunakan *template* hasil PCR pertama. Primer yang digunakan untuk PCR kedua, yaitu

GMTOPOF dan GMTOPOR yang menghasilkan produk sekitar 931 bp (Gambar 1).

Reagen PCR pada penelitian ini ialah *High fidelity platinum Taq DNA polymerase*.¹⁰ Panjang DNA target untuk amplifikasi seluruh area koding gen *MAGE-1*, yaitu 1.105 bp sehingga memerlukan penggunaan *Taq* yang memiliki fidelitas tinggi. Produk PCR ini kemudian dipurifikasi untuk dilakukan kloning ke vektor pET101/D-TOPO. Tujuan purifikasi ialah mendapatkan DNA murni dengan menghilangkan sisa *primer* dan pengotor lain seperti garam-garam, sisa enzim, agarosa, pewarna, etidium bromida, *mineral oil*, dan juga deterjen dari produk PCR. Purifikasi dilakukan menggunakan *Gel Extraction Kit* (Qiagen).

Produk PCR yang telah dipurifikasi kemudian diinsersikan ke vektor pET101/D-TOPO. Vektor yang digunakan yaitu pET101/D-TOPO dengan ukuran 5.753 bp serta tersedia dalam bentuk linier sehingga proses insersi dapat langsung dilakukan (*direct cloning*) tanpa terlebih dahulu melakukan restriksi plasmid, seperti pada penggunaan plasmid berbentuk sirkuler. Vektor pET101/D-TOPO mempunyai *promotor T7lac* untuk mengendalikan ekspresi dari gen yang diinginkan dan *lac operator* yang terletak pada *down stream* dari *T7 promoter*. *Lac operator* merupakan *binding site* untuk *lac represor* (*lacI gene*) yang berfungsi untuk menekan *basal transcription* plasmid di dalam *E. coli BL21star*.

E. coli Top10 dipergunakan untuk propagasi (memperbanyak atau amplifikasi molekul DNA target) dan juga *maintenance* (mempertahankan sekuens DNA target) serta untuk karakterisasi DNA plasmid rekombinan. Karakterisasi ini diperlukan untuk dapat mengetahui keberhasilan kloning dengan cara melakukan analisis struktur yang meliputi analisis restriksi dan sekuensing. *E. coli Top10* tidak mengandung gen *T7 RNA polymerase* sehingga DNA target tidak mampu diekspresikan menjadi protein dan kestabilan sekuens DNA plasmid rekombinan terjaga.

Plasmid rekombinan lalu ditransformasi pada *E. coli Top10*. *E. coli* disiapkan untuk menerima plasmid dengan menambahkan CaCl_2 sebelum melakukan transformasi pada *E. coli Top10*. Fungsi penambahan CaCl_2 untuk melemahkan dinding sel *E. coli* sehingga dapat mempermudah plasmid rekombinan masuk ke dalam *E. coli* pada saat proses *heat shock*. *E. coli* yang telah siap untuk digunakan transformasi disebut sel kompeten.

Plasmid rekombinan pETGM/Mage1-testis siap ditransformasi ke dalam sel kompeten *E. coli Top10*. Sel kompeten dikeluarkan dari *deep freezer* -80°C dan segera dimasukkan ke es serut agar

proses *thawing* berjalan lambat. Sel kompeten dicampur dengan plasmid rekombinan secara perlahan kemudian tube dimasukkan es serut lagi selama 30 menit agar plasmid rekombinan bercampur dan menyatu dengan sel kompeten. *Heat shock* dilakukan dalam *water bath* 42°C selama 45 detik untuk membuat kejutan pada sel kompeten sehingga plasmid rekombinan masuk melalui membran sel ke dalam sitoplasma *E. coli*. Tube yang mengandung plasmid rekombinan segera dimasukkan/direndam ke dalam es serut agar pori-pori yang terbentuk di membran *E. coli* segera menutup kembali sehingga plasmid yang sudah transformasi ke *E. coli* tidak keluar lagi. Kemudian ditambahkan media SOC yang kaya nutrisi untuk pertumbuhan *E. coli*. Hasil transformasi kemudian dikultur pada media seleksi, yaitu media LB agar yang mengandung ampisilin pada inkubator 37°C selama 16–18 jam.

Seleksi dilakukan dengan memberi antibiotik ampisilin. Plasmid didesain mengandung gen resisten ampisilin, yaitu gen β lactamase. Protein β laktamase disekresikan ke dalam media, lalu menghidrolisis ampisilin sehingga ampisilin itu tidak aktif. Sel transforman yang mengandung plasmid rekombinan akan tumbuh subur pada media seleksi yang mengandung ampisilin, sedangkan *E. coli* itu sendiri peka terhadap ampisilin sehingga *E. coli* yang tidak mengandung plasmid rekombinan tidak dapat tumbuh pada media seleksi. Kontrol negatif yang digunakan adalah *E. coli* yang sama, tetapi ditransformasi dengan *distilled water* yang tidak mengandung plasmid rekombinan. Hasil kontrol negatif itu menunjukkan bahwa *E. coli* tidak tumbuh pada media yang mengandung ampisilin. Keadaan ini menunjukkan bahwa *E. coli* yang tumbuh pada media LB yang mengandung ampisilin tersebut memang benar *E. coli* yang mengandung plasmid rekombinan.

Apabila sel transforman tumbuh pada media selektif yang mengandung ampisilin diharapkan proses kloning berhasil gen *Mage-1* dari jaringan testis normal telah terinsersi pada pET101/D-TOPO yang ditunjukkan dengan pertumbuhan koloni bakteri pada media seleksi (Gambar 2). Sel *hospes* akan memperbanyak diri dengan cara pembelahan yang diikuti oleh plasmid sehingga didapatkan klon sel transforman dalam jumlah banyak yang mengandung plasmid beserta molekul DNA rekombinan gen *Mage-1*.

Analisis plasmid rekombinan merupakan cara untuk mengetahui keberhasilan kloning DNA target pada plasmid yang meliputi uji restriksi dengan enzim restriksi *EcoRV* dan sekuensing

dengan analisis homologi. Analisis plasmid rekombinan dilakukan pada hasil isolasi plasmid rekombinan. Tujuan isolasi plasmid adalah memisahkan DNA plasmid rekombinan yang mengandung DNA target dari DNA kromosom bakteri. Isolasi DNA plasmid pada penelitian ini menggunakan kit *high speed plasmid mini kit* (Geneaid).

Analisis restriksi menggunakan enzim *EcoRV* yang termasuk enzim endonuklease tipe II dari *Escherichia coli*. Nama lainnya adalah *Eco32I*. *EcoRV* akan memotong *restriction site* GATATC secara *blunt end* pada TA. Panjang pET101/D-TOPO yaitu 5.753 bp, setelah dilakukan insersi area koding gen penyandi *Mage-1* yang terdiri atas 927 bp (karena dikurangi 3bp *stop codon*) sehingga total panjang DNA rekombinan pETGM/*Mage1*-testis adalah 6.680 bp (5.753+927) (Gambar 5). *EcoRV* memotong pada nukleotida ke 545 dan 4.775. Hasil restriksi *EcoRV*, adalah *band* dengan ukuran 4.230 dan 2.450 (4.230+2.450=6.680) (Gambar 4).

Sekuensing dilakukan menggunakan *primer T7 forward* serta *reverse*. *Primer T7 forward* menempel pada nukleotida 109–128 dan juga *T7 reverse* menempel pada nukleotida 1.381–1.402 setelah ditambah gen penyandi *Mage-1*. *Primer GMTPOF* menempel pada nukleotida 302 yang terletak setelah sekuens *promotor T7*. Hal ini penting karena aktivasi transkripsi pada plasmid menggunakan *promotor T7* sehingga gen *Mage-1* dapat ditranskripsi pada plasmid. *Stop codon* yang digunakan untuk menghentikan transkripsi adalah *stop codon* vektor yang terletak setelah penanda histidin (6x histidin). Penanda histidin ini dipakai untuk memudahkan purifikasi protein rekombinan menggunakan metode kromatografi afinitas *nickel nitrilotriacetic acid* (Ni-NTA) yang mampu mengikat histidin pada kolom nikel. Dengan demikian protein yang diperoleh tidak mengandung protein sel inang sehingga murni hanya protein target yang dimaksud di dalam penelitian.

Hasil sekuensing ini memperlihatkan bahwa gen penyandi *Mage-1* dari jaringan testis normal terdiri atas 927 nukleotida yang mengkode 309 asam amino termasuk *start* dan tanpa *stop codon*. Hal ini sesuai data gen *Mage-1* yang terdapat di *GeneBank*, yaitu gen *Mage-1* terdiri atas 3 ekson dan 2 intron. mRNA *Mage-1* terdiri atas 1.722 nukleotida, area koding terletak pada ekson 3 pada nukleotida 188–1.117 (927 nukleotida termasuk *start* dan tanpa *stop codon*). Setelah *stop codon* (nukleotida 1.117) masih terdapat beberapa nukleotida dan *poly tail A*.

Sekuens gen *Mage-1* dari jaringan testis yang

normal mempunyai homologi 100% dengan sekuens M77481 dan juga NM_004988 yang berasal dari jaringan melanoma kulit dan 99% dengan sekuens AY148486 yang berasal dari liver penderita karsinoma hepatoseluler dan BC017555 yang berasal dari jaringan melanoma kulit. Hal ini menunjukkan bahwa sekuens gen *Mage-1* pada penelitian ini dengan sekuens yang ada di *Gen Bank* dari jaringan kulit melanoma (M77481 dan juga NM_004988) adalah sama, tetapi mempunyai satu perbedaan nukleotida dari jaringan kulit melanoma (BC017555) dan sekuens dari liver penderita karsinoma hepatoseluler (AY148486). Satu nukleotida yang berbeda ini merupakan *polymorphisme*¹¹ tiga tipe nukleotida gen *Mage-1* dari jaringan liver penderita karsinoma hepatoseluler dengan kode nomer akses AY148486 dan AF463515, serta satu sekuens M77481 yang mempunyai sekuens sama.⁸

Hasil penelitian ini memperlihatkan bahwa sekuens gen *Mage-1* dari testis homolog dengan sekuens *Mage-1* dari jaringan liver penderita karsinoma hepatoseluler. Persamaan sekuens ini memperlihatkan bahwa protein *Mage-1* dari testis sama dengan protein *Mage-1* dari liver penderita karsinoma hepatoseluler. Hasil isolasi mRNA *Mage-1* dari testis dapat dipergunakan sebagai pengganti mRNA *Mage-1* dari jaringan liver penderita karsinoma hepatoseluler. Isolasi mRNA *Mage-1* dari jaringan liver penderita karsinoma hepatoseluler sulit dilakukan karena risiko perdarahan yang sulit dihentikan sehingga pembedahan pada liver penderita karsinoma hepatoseluler jarang dilakukan. Diagnosis pasien dilakukan memakai teknik FNAB dan tuntunan radiologi untuk mendapatkan hepatosit yang telah berubah menjadi sel kanker. Hasil FNAB ini sangat sedikit, hanya sekitar 6 *slide* sehingga diagnosis yang dibuat harus benar. Jika terdapat kasus sulit untuk membedakan sel jinak dengan ganas maka diperlukan kit diagnostik yang dapat digunakan untuk melakukan diagnosis.

Plasmid rekombinan pETGM/*Mage1*-testis dari sampel jaringan testis selanjutnya digunakan untuk penelitian lanjutan, yaitu mengekspresikan plasmid pada *E. coli* untuk menghasilkan protein rekombinan gen *Mage-1*. Protein rekombinan *Mage-1* yang disuntikkan ke hewan coba untuk menghasilkan antibodi anti *Mage-1* yang dapat digunakan sebagai antibodi untuk mendeteksi antigen (protein) *Mage-1* itu dari jaringan liver hepatoma. Penelitian ini merupakan penelitian awal dalam proses penelitian untuk pembuatan antibodi monoklonal anti *Mage-1* yaitu sebagai biomaterial sebagai pengembangan diagnosis

karsinoma hepatoseluler.

Simpulan, sekuens gen *Mage-1* dari testis homolog dengan sekuens *Mage-1* dari jaringan liver pada penderita karsinoma hepatoseluler. Penelitian ini menghasilkan plasmid rekombinan pETGM/*Mage1*-testis yang dapat dipergunakan untuk penelitian lanjutan dalam pengembangan kit diagnosis karsinoma hepatoseluler.

Daftar Pustaka

1. Caballero OL, Chen YT. Cancer/testis (CT) antigens: potential targets for immunotherapy. *Cancer Sci.* 2009;100(11): 2014–21.
2. Suzuki S, Sasajima K, Sato Y, Watnabe H, Matsutani T, Iida S, dkk. MAGE-A protein and MAGE-A10 gene expressions in liver metastasis in patients with stomach cancer. *Br J Cancer.* 2008;99(2):350–6.
3. Xiao J, Chen HS, Fei R, Cong X, Wang LP, Wang Y, dkk. Expression of MAGE-A1 mRNA is associated with gene hypomethylation in hepatocarcinoma cell lines. *J Gastroenterol.* 2005;40(7):716–21.
4. Calvisi DF, Ladu S, Gorden A, Farina M, Lee JS, Conner EA, dkk. Mechanistic and prognostic significance of aberrant methylation in the molecular pathogenesis of human hepatocellular carcinoma. *J Clin Invest.* 2007;117(9):2713–22.
5. Yang SZ, Dong JH, Li K, Zhang Y, Zhu J. Detection of AFPmRNA and Melanoma Antigen Gene-1 mRNA as markers of disseminated hepatocellular carcinoma cells in blood. *Hepatobiliary Pancreat Dis int.* 2005;4(2):227–32.
6. Lee TB, Lim SC, Moon YS, Choi CH. Melanoma antigen gene family as a molecular marker of gastric and colorectal cancers. *Oncol Rep.* 2013;30(1):234–8.
7. Mastutik G, Hardjowijoto S, Lunardi JH, Soemarsono T, Puspaningsih NNT, Budy TI, dkk. *Mage-1* cDNA isolation from testis with RT PCR. *Folia Medica Indonesiana.* 2007;43(4):195–200.
8. Mastutik G, Hardjowijoto S, Lunardi JH, Puspaningsih NNT, Soetjipto, Kusumobroto HO, dkk. Molecular analysis of the coding sequence of *Mage-1* gene from hepatocellular carcinoma patient and testis. *Folia Medica Indonesiana.* 2008;44(4):224–32.
9. Invitrogen. Champion pET Directional TOPO Expression Kits Version II. 2006. 25-0400.
10. Invitrogen. Platinum taq DNA polymerase

- high fidelity, manual book. 2006. [diunduh Januari 2015] Tersedia dari: <http://www.invitrogen.com>.
11. Wang LP, Chen HS, Mei MH, Qin LL, Cong X, Fei R, dkk. The genetic polymorphism of melanoma-associated antigen 1 in chinese normal donors and hepatoma patients. *Zhonghua Gan Zang Bing Za Zhi*. 2004;12(3):151-5.