

Berita Biologi

Jurnal Ilmu-ilmu Hayati



Diterbitkan oleh
Pusat Penelitian Biologi - LIPI

Berita Biologi merupakan Jurnal Ilmiah ilmu-ilmu hayati yang dikelola oleh Pusat Penelitian Biologi - Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia (LIPI), untuk menerbitkan hasil karya-penelitian (original research) dan karya-pengembangan, tinjauan kembali (review) dan ulasan topik khusus dalam bidang biologi. Disediakan pula ruang untuk menguraikan seluk-beluk peralatan laboratorium yang spesifik dan dipakai secara umum, standard dan secara internasional. Juga uraian tentang metode-metode berstandar baku dalam bidang biologi, baik laboratorium, lapangan maupun pengolahan koleksi biodiversitas. Kesempatan menulis terbuka untuk umum meliputi para peneliti lembaga riset, pengajar perguruan tinggi maupun pekarya-tesis sarjana semua strata. Makalah harus dipersiapkan dengan berpedoman pada ketentuan-ketentuan penulisan yang tercantum dalam setiap nomor.

Diterbitkan 3 kali dalam setahun yakni bulan April, Agustus dan Desember. Setiap volume terdiri dari 3 nomor.

Surat Keputusan Ketua LIPI

Nomor: 1326/E/2000, Tanggal 9 Juni 2000

Dewan Pengurus

Pemimpin Redaksi

B Paul Naiola

Anggota Redaksi

Andria Agusta, Dwi Astuti, Hari Sutrisno, Iwan Saskiawan

Kusumadewi Sri Yulita, Edi Mirmanto

Redaksi Pelaksana

Marlina Ardiyani

Desain dan Komputerisasi

Muhamad Ruslan, Deden Sumirat Hidayat

Sekretaris Redaksi/Korespondensi Umum

(berlangganan, surat-menyurat dan kearsipan)

Enok, Ruswenti, Budiarjo

Pusat Penelitian Biologi-LIPI
Kompleks Cibinong Science Center (CSC-LIPI)

Jln Raya Jakarta-Bogor Km 46,
Cibinong 16911, Bogor - Indonesia
Telepon (021) 8765066 - 8765067

Faksimili (021) 8765059

e-mail: berita.biologi@mail.lipi.go.id
ksama_p2biologi@yahoo.com
herbogor@indo.net.id

Keterangan foto cover depan: Selektifitas kukang jawa (*Nycticebus javanicus*) terhadap tumbuhan sebagai pakan dan sarangnya, sesuai makalah di halaman 111 (Foto: Koleksi LIPI - Wirdateti).



LIPI

Berita Biologi

Jurnal Ilmu-ilmu Hayati

ISSN 0126-1754

Volume 11, Nomor 1, April 2012

Terakreditasi A

SK Kepala LIPI

Nomor 180/AU1/P2MBI/08/2009

**Diterbitkan oleh
Pusat Penelitian Biologi - LIPI**

Ketentuan-ketentuan untuk Penulisan dalam Jurnal Berita Biologi

1. Makalah berupa karangan ilmiah asli, berupa hasil penelitian (original paper), komunikasi pendek atau tinjauan ulang (review) dan belum pernah diterbitkan atau tidak sedang dikirim ke media lain.
2. Bahasa: Indonesia baku. Penulisan dalam bahasa Inggris atau lainnya, dipertimbangkan.
3. Makalah yang diajukan tidak boleh yang telah dipublikasi di jurnal manapun ataupun tidak sedang diajukan ke jurnal lain. Makalah yang sedang dalam proses penilaian dan penyuntingan, tidak diperkenankan untuk ditarik kembali, sebelum ada keputusan resmi dari Dewan Redaksi.
4. Masalah yang diliput berisikan temuan penting yang mengandung aspek ‘kebaruan’ dalam bidang biologi dengan pembahasan yang mendalam terhadap aspek yang diteliti, dalam bidang-bidang:
 - Biologi dasar (*pure biology*), meliputi turunan-turunannya (mikrobiologi, fisiologi, ekologi, genetika, morfologi, sistematik/ taksonomi dan sebagainya).
 - Ilmu serumpun dengan biologi: pertanian, kehutanan, peternakan, perikanan air tawar dan biologi kelautan, agrobiologi, limnologi, agrobioklimatologi, kesehatan, kimia, lingkungan, agroforestri.
 - *Aspek/ pendekatan biologi* harus tampak jelas.
5. Deskripsi masalah: harus jelas adanya tantangan ilmiah (*scientific challenge*).
6. Metode pendekatan masalah: standar, sesuai bidang masing-masing.
7. Hasil: hasil temuan harus jelas dan terarah.
8. Tipe makalah
Makalah Lengkap Hasil Penelitian (original paper).
Makalah lengkap berupa hasil penelitian sendiri (original paper). Makalah ini tidak lebih dari 15 halaman termasuk gambar dan tabel. Pencantuman lampiran/*appendix* seperlunya. Redaksi berhak mengurangi atau meniadakan lampiran.
Komunikasi pendek (short communication)
Komunikasi pendek merupakan makalah pendek hasil riset yang oleh penelitiannya ingin cepat dipublikasi karena hasil temuan yang menarik, spesifik dan baru, agar lebih cepat diketahui umum. Berisikan pembahasan yang mendalam terhadap topik yang dibahas. Artikel yang ditulis tidak lebih dari 10 halaman. Dalam Komunikasi Pendek Hasil dan Pembahasan boleh disatukan.
Tinjauan kembali (Review)
Tinjauan kembali yakni rangkuman tinjauan ilmiah yang sistematis-kritis secara ringkas namun mendalam terhadap topik riset tertentu. Segala sesuatu yang relevan terhadap topik tinjauan sehingga memberikan gambaran “state of the art” meliputi kemajuan dan temuan awal hingga terkini dan kesenjangan dalam penelitian, perdebatan antarpeleliti dan arah ke mana topik riset akan diarahkan. Perhatikan kecerdasanmu dalam membuka peluang riset lanjut oleh diri sendiri atau orang lain melalui review ini.
9. Format makalah
 - a. Makalah diketik menggunakan huruf Times New Roman 12 point, spasi ganda (kecuali abstrak dan abstract 1 spasi) pada kertas A4 berukuran 70 gram.
 - b. Nomor halaman diletakkan pada sisi kanan bawah
 - c. Gambar dan foto maksimum berjumlah 4 buah dan harus bermutu tinggi. Gambar manual pada kertas kalkir dengan tinta cina, berukuran kartu pos. Foto berwarna akan dipertimbangkan, apabila dibuat dengan computer harus disebutkan nama programnya.
 - d. Makalah diketik dengan menggunakan program Word Processor.
10. Urutan penulisan dan uraian bagian-bagian makalah
 - a. Judul
Judul harus ringkas dan padat, maksimum 15 kata, dalam dwibahasa (Indonesia dan Inggris). Apabila ada subjudul tidak lebih dari 50 kata.
 - b. Nama lengkap penulis dan alamat koresponden
Nama dan alamat penulis(-penulis) lengkap dengan alamat, nomor telpon, fax dan email. Pada nama penulis(-penulis), diberi nomor superskrip pada sisi kanan yang berhubungan dengan alamatnya; nama penulis korespondensi (*correspondent author*), diberi tanda envelop (✉) superskrip. Lengkapi pula dengan alamat elektronik.
 - c. Abstrak dan Kata kunci

- Abstrak dan kata kunci ditulis dalam dwibahasa (Indonesia dan Inggris), maksimum 200 kata, spasi tunggal, tanpa referensi.
- d. Pendahuluan
Berisi latar belakang, masalah, hipotesis dan tujuan penelitian. Ditulis tanpa subheading.
 - e. Bahan dan cara kerja
Apabila metoda yang digunakan sudah baku dan merupakan ulangan dari metoda yang sudah ada, maka hanya ditulis sitiran pustakanya. Apabila dilakukan modifikasi terhadap metoda yang sudah ada, maka dijelaskan bagian mana yang dimodifikasi.
Apabila terdapat uraian lokasi maksi diberikan 2 macam peta, peta besar negara sebagai inset dan peta detil lokasi.
 - f. Hasil
Bagian ini menyajikan hasil utama dari penelitian. *Hasil* dipisahkan dari *Pembahasan*
 - g. Pembahasan
Pembahasan dibuat terpisah dari hasil tanpa pengulangan penyajian hasil penelitian. Dalam Pembahasan hindari pengulangan subjudul dari Hasil, kecuali dipandang perlu sekali.
 - h. Kesimpulan
Kesimpulan harus menjawab pertanyaan dan hipotesis yang diajukan di bagian pendahuluan.
 - i. Ucapan Terima Kasih
Ditulis singkat dan padat.
 - j. Daftar pustaka
Cara penulisan sumber pustaka: tuliskan nama jurnal, buku, prosiding atau sumber lainnya secara lengkap, jangan disingkat. Nama inisial pengarang tidak perlu diberi tanda titik pemisah.
 - i. Jurnal
Premachandra GS, H Saneko, K Fujita and S Ogata. 1992. Leaf Water Relations, Osmotic Adjustment, Cell Membrane Stability, Epicuticular Wax Load and Growth as Affected by Increasing Water Deficits in Sorghum. *Journal of Experimental Botany* **43**, 1559-1576.
 - ii. Buku
Kramer PJ. 1983. *Plant Water Relationship*, 76. Academic, New York.
 - iii. Prosiding atau hasil Simposium/Seminar/Lokakarya dan sebagainya
Hamzah MS dan SA Yusuf. 1995. Pengamatan Beberapa Aspek Biologi Sotong Buluh (*Septoteuthis lessoniana*) di Sekitar Perairan Pantai Wokam Bagian Barat, Kepulauan Aru, Maluku Tenggara. *Prosiding Seminar Nasional Biologi XI*, Ujung Pandang 20-21 Juli 1993. M Hasan, A Mattimu, JG Nelwan dan M Litaay (Penyunting), 769-777. Perhimpunan Biologi Indonesia.
 - iv. Makalah sebagai bagian dari buku
Leegood RC and DA Walker. 1993. Chloroplast and Protoplast. In: *Photosynthesis and Production in a Changing Environment*. DO Hall, JMO Scurlock, HR Bohlar Nordenkampf, RC Leegood and SP Long (Eds), 268-282. Chapman and Hall. London.
11. Lain-lain menyangkut penulisan
- a. Gambar.
Lebar gambar maksimal 8,5 cm. Judul gambar menggunakan huruf Times New Roman ukuran 8 point.
 - b. Grafik
Untuk setiap perhitungan rata-rata, selalu diberikan standar deviasi. Penulis yang menggunakan program Excell harus memberikan data mentahnya.
 - c. Foto
Untuk setiap foto, harap diberikan skala bila perlu, dan berikan anak panah untuk menunjukkan suatu objek.
 - d. Tabel
Judul tabel harus ringkas dan padat. Judul dan isi tabel diketik menggunakan huruf Times New Roman ukuran 8 point. Seluruh penjelasan mengenai tabel dan isinya harus diberikan setelah judul tabel.
 - e. Gunakan simbol: ○ ● □ ■ △ ▲

- f. Semua nama biologi pada makhluk hidup yang dipakai, pada Judul, Abstrak dan pemunculan pertama dalam Badan teks, harus menggunakan nama yang valid disertai author/descriptor. (Burung Maleo – *Macrocephalon maleo* S. Müller, 1846; Cendana – *Santalum album* L.), atau yang tidak memiliki nama author *Escherichia coli*. Selanjutnya nama-nama biologi disingkat (*M. maleo*, *S. album*, *E. coli*).
 - g. Proof reading
Proof reading akan dikirim lewat e-mail/fax, atau bagi yang berdinasi di Bogor dan Komplek Cibinong Science Center (CSC-LIPI) dan sekitarnya, akan dikirim langsung; dan harus dikembalikan kepada dewan redaksi paling lambat dalam 3 hari kerja.
 - h. Reprint/ cetak lepas
Penulis akan menerima satu copy jurnal dan 3 reprint/cetak lepas makalahnya.
12. Seluruh makalah yang masuk ke meja redaksi Berita Biologi akan dinilai oleh dewan editor untuk kemudian dikirim kepada reviewer/mitra bestari yang tertera pada daftar reviewer BB. Redaksi berhak menjajagi pihak lain sebagai reviewer undangan.
 13. Kirimkan 2 (dua) eksemplar makalah ke Redaksi (lihat alamat pada cover depan-dalam). Satu eksemplar tanpa nama dan alamat penulis (-penulis)nya. Sertakan juga softcopy file dalam CD untuk kebutuhan Referee/Mitra bestari. Kirimkan juga filenya melalui alamat elektronik (e-mail) resmi Berita Biologi: berita.biologi@mail.lipi.go.id dan di-Cc-kan kepada: ksama_p2biologi@yahoo.com, herbogor@indo.net.id
 14. Sertakan alamat Penulis (termasuk elektronik) yang jelas, juga meliputi nomor telepon (termasuk HP) yang dengan mudah dan cepat dihubungi.

Anggota Referee / Mitra Bestari

Mikrobiologi

Dr Bambang Sunarko (*Pusat Penelitian Biologi-LIPI*)
Prof Dr Feliatra (*Universitas Riau*)
Dr Heddy Julistiono (*Pusat Penelitian Biologi-LIPI*)
Dr I Nengah Sujaya (*Universitas Udayana*)
Dr Joko Sulistyono (*Pusat Penelitian Biologi-LIPI*)
Dr Joko Widodo (*Universitas Gajah Mada*)
Dr Lisdar I Sudirman (*Institut Pertanian Bogor*)
Dr Ocky Karna Radjasa (*Universitas Diponegoro*)

Mikologi

Dr Dono Wahyuno (*BB Litbang Tanaman Rempah dan Obat-Kemtan*)
Dr Kartini Kramadibrata (*Pusat Penelitian Biologi-LIPI*)

Genetika

Prof Dr Alex Hartana (*Institut Pertanian Bogor*)
Dr Warid Ali Qosim (*Universitas Padjadjaran*)
Dr Yuyu Suryasari Poerba (*Pusat Penelitian Biologi-LIPI*)

Taksonomi

Dr Ary P Keim (*Pusat Penelitian Biologi-LIPI*)
Dr Daisy Wowor (*Pusat Penelitian Biologi-LIPI*)
Prof (Ris) Dr Johanis P Moge (Pusat Penelitian Biologi-LIPI)
Dr Rosichon Ubaidillah (*Pusat Penelitian Biologi-LIPI*)

Biologi Molekuler

Prof (Ris) Dr Eni Sudarmonowati (*Pusat Penelitian Bioteknologi-LIPI*)
Dr Endang Gati Lestari (*BB Litbang Bioteknologi dan Sumberdaya Genetik Pertanian-Kemtan*)
Dr Hendig Winarno (*Badan Tenaga Atom Nasional*)
Prof (Ris) Dr I Made Sudiana (*Pusat Penelitian Biologi-LIPI*)
Dr Nurlina Bermawie (*BB Litbang Tanaman Rempah dan Obat-Kemtan*)
Dr Yusnita Said (*Universitas Lampung*)

Bioteknologi

Dr Nyoman Mantik Astawa (*Universitas Udayana*)
Dr Endang T Margawati (*Pusat Penelitian Bioteknologi-LIPI*)
Dr Satya Nugroho (*Pusat Penelitian Bioteknologi-LIPI*)

Veteriner

Prof Dr Fadjar Satrija (*FKH-IPB*)

Biologi Peternakan

Prof (Ris) Dr Subandryono (*Pusat Penelitian Ternak-Kemtan*)

Ekologi

Dr Didik Widyatmoko (*Pusat Konservasi Tumbuhan-LIPI*)
Dr Dewi Malia Prawiradilaga (*Pusat Penelitian Biologi-LIPI*)
Dr Frans Wospakrik (*Universitas Papua*)
Dr Herman Daryono (*Pusat Penelitian Hutan-Kemhut*)
Dr Istomo (*Institut Pertanian Bogor*)
Dr Michael L Riwu Kaho (*Universitas Nusa Cendana*)
Dr Sih Kahono (*Pusat Penelitian Biologi-LIPI*)

Biokimia

Prof Dr Adek Zamrud Adnan (*Universitas Andalas*)
Dr Deasy Natalia (*Institut Teknologi Bandung*)
Dr Elfahmi (*Institut Teknologi Bandung*)
Dr Herto Dwi Ariesyadi (*Institut Teknologi Bandung*)
Dr Tri Murningsih (*Pusat Penelitian Biologi-LIPI*)

Fisiologi

Prof Dr Bambang Sapto Purwoko (*Institut Pertanian Bogor*)
Prof (Ris) Dr Gono Semiadi (*Pusat Penelitian Biologi-LIPI*)
Dr Irawati (*Pusat Konservasi Tumbuhan-LIPI*)
Dr Nuril Hidayati (*Pusat Penelitian Biologi-LIPI*)
Dr Wartika Rosa Farida (*Pusat Penelitian Biologi-LIPI*)

Biostatistik

Ir Fahren Bukhari, MSc (*Institut Pertanian Bogor*)

Biologi Perairan Darat/Limnologi

Dr Cynthia Henny (*Pusat Penelitian Limnologi-LIPI*)
Dr Fauzan Ali (*Pusat Penelitian Limnologi-LIPI*)
Dr Rudhy Gustiano (*Balai Riset Perikanan Budidaya Air Tawar-KKP*)

Biologi Tanah

Dr Rasti Saraswati (*BB Sumberdaya Lahan Pertanian-Kemtan*)

Biodiversitas dan Iklim

Dr Rizaldi Boer (*Institut Pertanian Bogor*)
Dr. Tania June (*Institut Pertanian Bogor*)

Biologi Kelautan

Prof Dr Chair Rani (*Universitas Hasanuddin*)
Dr Magdalena Litaay (*Universitas Hasanuddin*)
Prof (Ris) Dr Ngurah Nyoman Wiadnyana (*Pusat Riset Perikanan Tangkap-KKP*)
Dr Nyoto Santoso (*Lembaga Pengkajian dan Pengembangan Mangrove*)

Berita Biologi menyampaikan terima kasih
kepada para Mitra Bestari/ Penilai (Referee) nomor ini
11(1) – April 2012

Dr. Endang Tri Margawati – *Pusat Penelitian Bioteknologi – LIPI*
Dr. Joko Sulistyono – *Pusat Penelitian Biologi – LIPI*
Magdalena Litaay, PhD – *FMIPA – Universitas Hassanudin*
Dr. Nuril Hidayati – *Pusat Penelitian Biologi – LIPI*
Dr. Nurliani Bernawie – *BB. Biogen – Badan Litbang Kementan*
Ir. Titi Juhaeti. M.Si – *Pusat Penelitian Biologi – LIPI*
Dr. Ir. Warid Ali Qosim, MS – *Fak. Pertanian – UNPAD*
Dr. Yulita Kusumadewi – *Pusat Penelitian Biologi – LIPI*

Referee/ Mitra Bestari Undangan

Dr. Entang Iskandar – *Pusat Studi Satwa Primata – IPB*
Prof. Dr. Ibnu Maryanto – *Pusat Penelitian Biologi – LIPI*
Prof. MF.Rahardjo – *Fak. Perikanan dan Ilmu kelautan – IPB*
Dr. I. Nyoman P. Aryantha – *Dep. Biologi FMIPA – ITB*

DAFTAR ISI

TINJAUAN ULANG (REVIEW)**TINJAUAN TENTANG KOPEPODA PARASIT DI INDONESIA****[A Review of Parasitic Copepods in Indonesia]***Conni Sidabalok* 1**MAKALAH HASIL RISET (ORIGINAL PAPERS)****IDENTIFIKASI ALEL GEN *Xa7* PADA PLASMA NUTFAH PADI LOKAL
PAREKALIGOLARA MELALUI UJI SEGREGASI FENOTIPE DAN GENOTIPE****[Identification of *Xa7* Alleles Gene in Landrace Parekaligolara by Phenotype and Genotype Segregation Analysis]***Dwinita W Utami, TS Kadir dan A Nasution* 15**ADAPTASI OSMOTIK TUMBUHAN MANGROVE *Avicennia marina* (Forsskål) Vierh.
DAN KEDELAI (*Glycine max* (L.) Merr.) TERHADAP STRES SALINE****[Osmotic Adaptation of Mangrove *Avicennia marina* (Forsskål) Vierh. and Soybean (*Glycine max* (L.) Merr.) against Saline Stress]***BP Naiola* 23**KEANEKARAGAMAN JENIS TUMBUHAN PEMAKAN SERANGGA DAN LAJU
FOTOSINTESISNYA DI PULAU NATUNA****[Diversity of Insectivorous Plants and Its Photosynthesis Rate In Natuna Island]***Muhammad Mansur* 33**ANALISIS IMUNOGENISITAS PROTEIN GRA1 DARI HASIL KLONING GEN *GRA1*
TAKIZOIT *Toxoplasma gondii*****[Immunogenicity Analysis of GRA1 Protein derived from clone bearing *GRA1* Genes collected from *Toxoplasma gondii* Tachyzoite]***Didik T Subekti, WT Artama, SH Poerwanto, E Sulistyarningsih dan Yulia Sari* 43**KOI HERPES VIRUS SEBAGAI PENYEBAB KEMATIAN MASSAL PADA *Cyprinus carpio*
koi DI INDONESIA****[Koi Herpes Virus The Causative Agent of Sporadically Mortality of *Cyprinus carpio koi* in Indonesia]***S Oetami Madyowati, Sumaryam, A Kusyairi dan H Suprpto* 53**ANALISIS PERUBAHAN POLA GENETIKEMPAT GENERASI MANGGIS (*Garcinia man-
gostana* L.) BERDASARKAN MARKA ISSR****[Analysis of Genetic Pattern Changes among Four Generations of Mangosteen (*Garcinia man-
gostana* L.) Based on ISSR Marker]***Siti Noorrohmah, Sobir dan D Efendi* 59**PENGARUH BEBERAPA PAKET PEMUPUKAN DAN AMELIORASI TERHADAP
PERTUMBUHAN DAN HASIL TANAMAN KACANG TANAH (*Arachis hypogaea* L.)
DI KAWASAN PENGEMBANGAN LAHAN GAMBUT (PLG)****[Effect of Amelioration and Fertilization Packages on Growth and Yield Peanut (*Arachis hypo-
gaea* L.) in the Area Peatland Development (PLG)]***Siti Nurzakiah, Koesrini dan Khairil Anwar* 67

POTENSI <i>Enterolobium cyclocarpum</i> (Willd.) Griseb DAN <i>Centrosema pubescens</i> Benth. SEBAGAI AKUMULATOR PENCEMAR MERKURI [POTENCY OF <i>Enterolobium cyclocarpum</i> (Willd.) Griseb AND <i>Centrosema pubescens</i> Benth. AS MERCURY ACCUMULATORS] <i>Nuril Hidayati</i>	73
SIFAT ANTIOKSIDAN, KANDUNGAN FENOLAT TOTAL dan FLAVONOID TOTAL EKSTRAK KULIT BATANG MERTAPANG (<i>Terminalia copelandii</i> Elmer) [Antioxidant Properties, Total Phenolic and Total Flavonoid Content of Mertapang (<i>Terminalia copelandii</i> Elmer) Bark Extract] <i>Tri Murningsih</i>	85
SPATIAL MODEL OF SUMATRAN TIGER (<i>Panthera tigris sumatrae</i>) POTENTIAL HABITAT SUITABILITY IN BUKIT BARISAN SELATAN NATIONAL PARK, INDONESIA [Model Spasial Kesesuaian Habitat Harimau Sumatra (<i>Panthera tigris sumatrae</i>) di Taman Nasional Bukit Barisan Selatan, Indonesia] <i>Suyadi, I Nengah Surati Jaya, Antonius B Wijanarto and Haryo Tabah Wibisono</i>	93
ANALISA VEGETASI TEMPAT TUMBUH <i>Hoya purpureofusca</i> HOOK.F. DI RESORT SELABINTANA, TAMAN NASIONAL GUNUNG GEDE PANGRANGO [Vegetation analysis of habitat <i>Hoya purpureofusca</i> Hook.f. at the Selabintana Resort, Mount Gede Pangrango National Park] <i>Syamsul Hidayat, Sri Rahayu dan Kartika Ningtyas</i>	103
SEBARAN DAN HABITAT KUKANG JAWA (<i>Nycticebus javanicus</i>) DI AREA PERKEBUNAN SAYUR GUNUNG PAPANDAYAN, KABUPATEN GARUT [Distribution and Habitat on Javan Slow Loris (<i>Nycticebus javanicus</i>) in Vegetables Garden at Mount Papandayan, Garut District Area] <i>Wirdateji</i>	111
ANALISA KANDUNGAN LOVASTATIN, PIGMEN DAN CITRININ PADA FERMENTASI BERAS IR 42 DENGAN MUTAN <i>Monascus purpureus</i> Analysis of Lovastatin, Pigments And Citrinin in Rice Which Fermented by <i>Monascus purpureus</i> Mutant <i>T Yulinery dan N Nurhidayat</i>	119
CEKAMAN OKSIDASI SEL KHAMIR <i>Candida tropicalis</i> YANG DIPERLAKUKAN DENGAN PARASETAMOL DAN ANTIOKSIDAN (+)-CATECHIN [Oxidative Stress in <i>Candida tropicalis</i> Treated with Paracetamol and Antioxidant (+)-catechin] <i>Heddy Julistiono</i>	131

**ANALISIS IMUNOGENISITAS PROTEIN GRA1 DARI HASIL KLONING
GEN *GRA1* TAKIZOIT *Toxoplasma gondii**
[Immunogenicity Analysis of GRA1 Protein Derived from Clone Bearing *GRA1* Genes
Collected from *Toxoplasma gondii* Tachyzoite]**

Didik T Subekti^{1✉}, WT Artama², SH Poerwanto³, E Sulistyaningsih⁴ dan Yulia Sari⁴

¹Balai Besar Penelitian Veteriner, Bogor; ²Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta;

³Fakultas Biologi Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta; ⁴Program Studi Bioteknologi PAU Bioteknologi Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta. ✉e-mail: subekti.vmd@lycos.com

ABSTRACT

The study was aimed to analyze the immunogenicity of GRA1 protein derived from clone bearing *GRA1* genes from local isolate of *Toxoplasma gondii*. Analysis of GRA1 protein translated from cDNA of *GRA1* is very essential in prior to expressed the gene. Analysis of GRA1 protein derived from clone bearing *GRA1* genes was performed using several bioinformatics software which are available as stand-alone or online software such as CLC Bio Workbench series, BioEdit, BESTORF, GENSCAN, FGENES, BepiPred 1.0, CTL Epitope Finder and SignalP. Translation coding sequences of *GRA1* gene into GRA1 peptide sequences revealed 190 amino acids with molecular mass of GRA1 approximately 20.159 kD and isoelectric point at 4.43. GRA1 protein also identified several antigenic domains with six domains were known as epitopes for CD8⁺/cytotoxic lymphocyte and seven domain as epitopes for B lymphocyte. However, GRA1 protein was considered as good antigen but less immunogenic.

Keywords: GRA1 protein, *Toxoplasma gondii*, bioinformatics, antigenicity, immunogenicity.

ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan untuk menganalisis imunogenitas protein GRA1 yang dikode oleh gen *gral* (klon cDNA *gral*) dari *Toxoplasma gondii* isolat lokal. Analisis protein GRA1 yang ditranslasi dari cDNA *gral* sangat diperlukan sebelum diekspresikan. Analisis protein GRA1 dilakukan menggunakan beberapa perangkat lunak yaitu CLC Bio Workbench series, BioEdit, BESTORF, GENSCAN, FGENES, BepiPred 1.0, CTL Epitope Finder and SignalP. Hasil translasi gen *gral* menunjukkan bahwa protein GRA1 memiliki 190 asam amino dengan berat molekul 20,159 kD serta titik isoelektrik 4,43. Protein GRA1 juga diketahui memiliki beberapa tapak antigenik. Enam tapak antigenik sebagai epitop untuk limfosit T sitotoksik / CD8⁺ dan tujuh tapak antigenik sebagai epitop limfosit B. Protein GRA1 merupakan antigen yang baik tetapi memiliki imunogenitas lemah.

Kata kunci : protein GRA1, *Toxoplasma gondii*, bioinformatik, antigenitas, imunogenitas.

PENDAHULUAN

Toksoplamosis merupakan penyakit zoonosis yang disebabkan oleh protozoa *Toxoplasma gondii* yang merupakan organisme eukaryota bersifat obligat intraseluler dari kelompok protozoa. Oleh karenanya sistem pertahanan tubuh spesifik (imunitas spesifik) yang terbangkitkan oleh infeksi *T.gondii* adalah sistem imun adaptif humoral maupun berperantara sel. Respon imun adaptif humoral akan diperankan oleh antibodi yang dihasilkan limfosit B. Adapun respon imun adaptif berperantara sel akan diperankan oleh limfosit T (khususnya limfosit T sitotoksik) beserta respon imun natural.

Pada dasarnya baik IgG maupun sel T sitotoksik /CD8⁺ dapat mengenali bahan asing karena adanya peptida imunogenik dari suatu molekul protein. Oleh sebab itu determinasi awal dari adanya

peptida imunogenik yang berasal dari suatu runutan (*sequence*) DNA sangat penting untuk menentukan imunogenitas dari suatu protein yang disandinya. Apabila suatu runutan peptida imunogenik dapat ditemukan pada suatu gen maka kemungkinan protein tersebut akan bersifat imunogenik.

Studi melalui pendekatan molekuler telah dilakukan dan berhasil melakukan kloning sejumlah cDNA (*complementary DNA*) dari *T.gondii* koleksi isolat lokal. Salah satu diantaranya adalah cDNA *gral* dari *T. gondii* yang diharapkan bersifat imunogenik (Subekti *et al.*, 2008). *Complementary DNA* (cDNA) merupakan komplementer dari mRNA sehingga dalam sekuen nukleotidanya tidak lagi ditemukan adanya intron. Hasil analisis awal menunjukkan bahwa klon tersebut merupakan *full length sequence* dari gen *gral* milik *T.gondii* isolat

*Diterima: 19 Agustus 2011 - Disetujui: 14 Januari 2012

lokal (Subekti *et al.*, 2008). Analisis terhadap beberapa karakter fisik, biokimia dan potensi imunogenitas-antigenitas dari protein GRA1 perlu dilakukan mengingat protein tersebut sangat esensial untuk kehidupan *T. gondii* secara intraseluler.

Protein GRA1 merupakan salah satu protein yang diperlukan oleh *T. gondii* untuk melakukan modifikasi Vakuola Parasitoforus (VP). Modifikasi ini sangat bermanfaat bagi kehidupan intraselulernya sekaligus untuk menghindarkan dari respon imun (evasi respon imun) sehingga tidak dikenali oleh sistem imun tubuh. Apabila modifikasi tersebut dapat dihambat, maka diharapkan proses pembentukan VP tidak akan berlangsung dengan baik sehingga dapat mengganggu atau juga dapat dikenali oleh sistem imun. Oleh sebab itu penelitian ini dimaksudkan untuk menganalisis protein GRA1 yang dikode oleh gen *gral* (klon cDNA *gral*) agar diketahui potensinya sebagai kandidat imunogen yang kelak diharapkan dapat digunakan untuk menginduksi respon imun adaptif humoral dan seluler. Dengan demikian diharapkan kelak dapat dipergunakan untuk kepentingan berbagai intervensi imunologis sebelum dilakukan ekspresi gen tersebut.

BAHAN DAN METODE

Isolasi Plasmid dan Sekuensing cDNA GRA1

Klon cDNA *GRA1* yang telah diperoleh sebelumnya telah disisipkan ke dalam plasmid *pGEM-T Easy Vector* dan telah ditransformasi ke dalam bakteri kompeten *E.coli XL-1 Blue*. Sebelum dilakukan sekuensing dan analisis sekuen nukleotida, plasmid rekombinan terlebih dahulu diisolasi dari bakteri kompeten *E.coli XL-1 Blue* yang dibiakkan dalam media LB (*Luria Broth Agar*).

Media LB yang mengandung koloni bakteri dengan plasmid rekombinan hasil biakan tersebut dipindahkan ke tabung ependorf dan disentrifugasi pada 12.000 rpm selama 30 detik. Pelet dikoleksi dan diresuspensi dengan 100 μ l *lysing solution I (Tris-EDTA-Glucose (TEG): 1 M Tris-0,5 M EDTA-2 M glukosa)* kemudian ditambahkan 200 μ l *lysing solution II (0,2 N NaOH dan 1% SDS)*, dihomogenkan dan diinkubasi ke dalam *ice bath*. Berikutnya ditambahkan 150 μ l *lysing solution III (5*

M kalium asetat, asam asetat), dihomogenisasi dan diinkubasi selama 5 menit dalam *ice bath* dilanjutkan dengan sentrifus pada 12.000 rpm selama 5 menit.

Bagian atas (supernatan) dipindahkan ke dalam tabung ependorf baru dan ditambahkan fenol:kloroform:isoamil alkohol (25:24:1) dengan perbandingan volume yang sama. Campuran larutan tersebut disentrifus kembali dengan kecepatan 12.000 rpm selama 2 menit. Fase atas yang bening dipindahkan ke tabung baru dan ditambahkan etanol absolut dingin (2:1= supernatan : etanol absolut). Presipitasi dilakukan pada suhu -70°C selama 1 jam, diikuti dengan sentrifus pada 12.000 rpm selama 5 menit. Pelet dibilas dengan etanol 70%, dikeringanginkan dan diresuspensi dengan TE. Plasmid yang diperoleh kemudian dikirim ke BPPT (Badan Pengkajian dan Penerapan Teknologi, Jakarta) untuk dilakukan sekuensing menggunakan *BigDye Terminator ABI PRISM 373 DNA Sequencer*.

Analisis Sekuen Nukleotida

Hasil sekuensing dianalisis untuk beberapa modifikasi dan diuji homologinya dengan data *GRA1* di *gene bank* sekaligus ditentukan juga lokasi ORF (*open reading frame*) nya menggunakan program CLC Bio Workbench Series (CLC Bio Free 3.0, dan CLC Bio Gene 1.5), BioEdit, BESTORF, FGENSEM dan GENSCAN. Analisis selanjutnya adalah translasi hasil sekuensing kedalam sekuen nukleotida protein dilakukan dengan menggunakan beberapa program bioinformatika yaitu CLC Bio Workbench Series (CLC Bio Free 3.0, dan CLC Bio Protein 1.5), PredictProtein, PHDTopology, SignalP 3.0, TargetP 1.1, BepiPred 1.0, dan CTL Epitope Finder 1.1. Masing masing hasil analisis digunakan untuk pengujian silang sehingga dapat diperoleh kesepakatan hasil yang konsisten dari berbagai macam program yang dipergunakan.

HASIL

Deskripsi Hasil Translasi Protein GRA1, Titik Isoelektrik dan Peptida Sinyal

Determinasi *open reading frame* (ORF) diperlukan untuk menentukan CDS (*coding sequences*) protein GRA1. Analisis hasil sekuen

dengan berbagai perangkat lunak (*software*) yang digunakan, menunjukkan hasil yang sama dalam penetapan ORF dan CDS. Selanjutnya sekuen kodon dari gen *graI* ditranslasi menjadi protein GRA1 dan dianalisis lokasi peptida sinyalnya sebagaimana terlihat pada Gambar 1.

Umumnya protein pada organisme tersusun atas rangkaian asam amino berulang (*repertoire*) dari 20 jenis asam amino yang telah diketahui (Stryer, 1998). Protein GRA1 yang dianalisis dengan CLC Bio Protein Workbench (CBPW), terdiri atas 18 jenis asam amino (Tabel 1) dan memiliki panjang runutan peptida 190 asam amino seperti dideskripsikan pada Gambar 1.

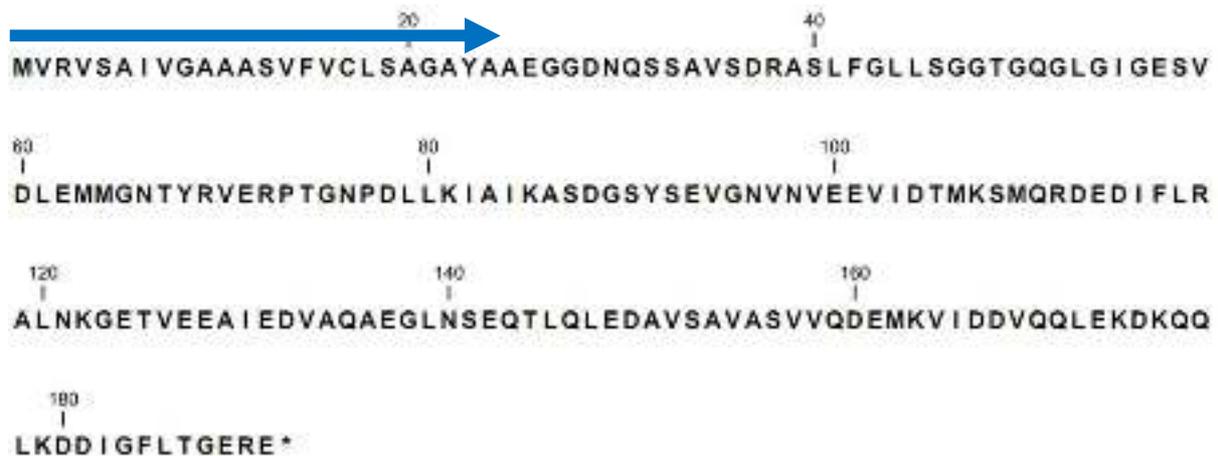
Determinasi fungsi dari peptida sinyal dianalisis lebih lanjut menggunakan program

TargetP (Tabel 2). Fungsi dari peptida sinyal tersebut diperkirakan adalah sinyal untuk sekresi. Adapun berdasarkan jenis asam amino penyusunnya, maka dapat ditentukan berat molekul dan titik isoelektrik dari protein GRA1 (Gambar 2). Titik isoelektrik dari protein GRA1 diperkirakan 4,43.

Determinasi Area Hidrofilik dan Tapak Antigenik Protein GRA1

Berdasarkan hasil analisis dengan berbagai perangkat lunak, dapat diperkirakan bahwa protein GRA1 memiliki sekitar 9 tapak antigenik, lihat Gambar 3. Sementara hasil analisis antigenisitas dan hidrofobisitas dengan CBPW 3.0, ditampilkan pada Gambar 4.

Analisis lebih lanjut dilakukan untuk



Gambar 1. Hasil Translasi dan Determinasi Peptida Sinyal pada Protein GRA1. Translasi gen *graI* menjadi sekuen peptidaprotein GRA1 menggunakan Program CLC Bio Protein Workbench. Panah warna biru menunjukkan lokasi Peptida Sinyal yang dideterminasi dengan Program SignalP.

Tabel 1. Deskripsi Jenis Asam Amino pada Protein GRA1

Asam Amino	Σ	Frekuensi	Asam Amino	Σ	Frekuensi
Alanin (A)	19	0,100	Metionin (M)	6	0,032
Sistein (C)	1	0,005	Asparagin (N)	7	0,037
Asam Aspartat (D)	16	0,084	Prolin (P)	2	0,011
Asam Glutamat (E)	19	0,100	Glutamin (Q)	11	0,058
Fenilalanin (F)	4	0,021	Arginin (R)	7	0,037
Glisin (G)	19	0,100	Serin (S)	16	0,084
Histidin (H)	0	0,000	Treonin (T)	7	0,037
Isoleusin (I)	9	0,047	Valin (V)	20	0,105
Lisin (K)	8	0,042	Triptofan (W)	0	0,000
Leusin (L)	16	0,084	Tirosin (Y)	3	0,016

Tabel 2. Determinasi Sekuen dan Fungsi Peptida Sinyal pada Protein GRA 1 *T.gondii*

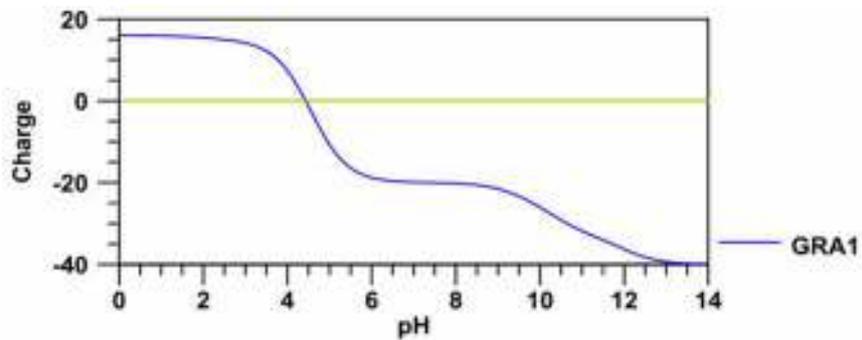
Protein	SignalP		TargetP		Runutan peptida
	NN	HMM	Loc	RC	
GRA1	Ya	0,999	S	2	MVRVSAIVGAAASVFLSAGAYA

Keterangan :

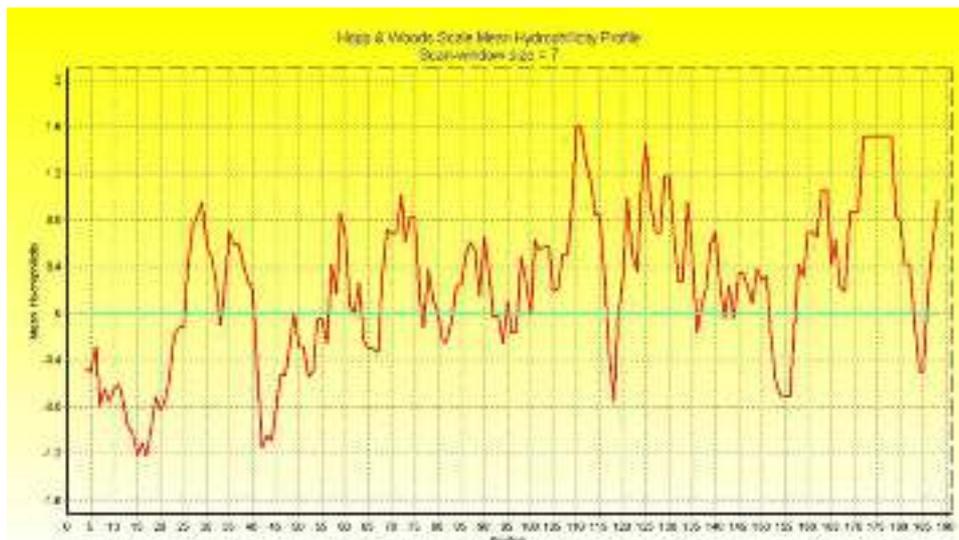
NN: analisis peptida sinyal berdasarkan algoritma Neural Network; HMM: analisis peptida sinyal berdasarkan algoritma Hidden Markov Model (angka menunjukkan probabilitas, 1 = semakin kuat prediksinya); * menunjukkan adanya suatu sekuen sinyal tetapi mengarah pada *signal anchor* dengan probabilitas 0,919.

Loc: prediksi lokasi, misalnya; M = translokasi menuju mitokondria, S = sekretorik, O = lokasi lainnya, C = kloroplas, * = tidak diketahui tujuan translokasinya.

RC: klas reliabilitas (skor 1 – 5), 1 = indikasi prediksinya sangat kuat; 5 = indikasi prediksinya sangat lemah.



Gambar 2. Grafik Perubahan Muatan Listrik dari Protein GRA1 pada berbagai pH. Garis biru: dinamika muatan listrik dari protein GRA1. Garis hijau: garis linier dimana muatan listrik bernilai nol.



Gambar 3. Hasil Analisis Hidrofobisitas – Hidrofilisitas dengan Program BioEdit Berdasarkan Skala Hoop-Woods pada Window size of 7. Nilai skala negatif menunjukkan regio yang bersifat hidrofilik dan antigenik. Nilai skala positif menunjukkan regio yang bersifat hidrofobik; tanda berupa garis hitam menunjukkan lokasi tapak antigeniknya.

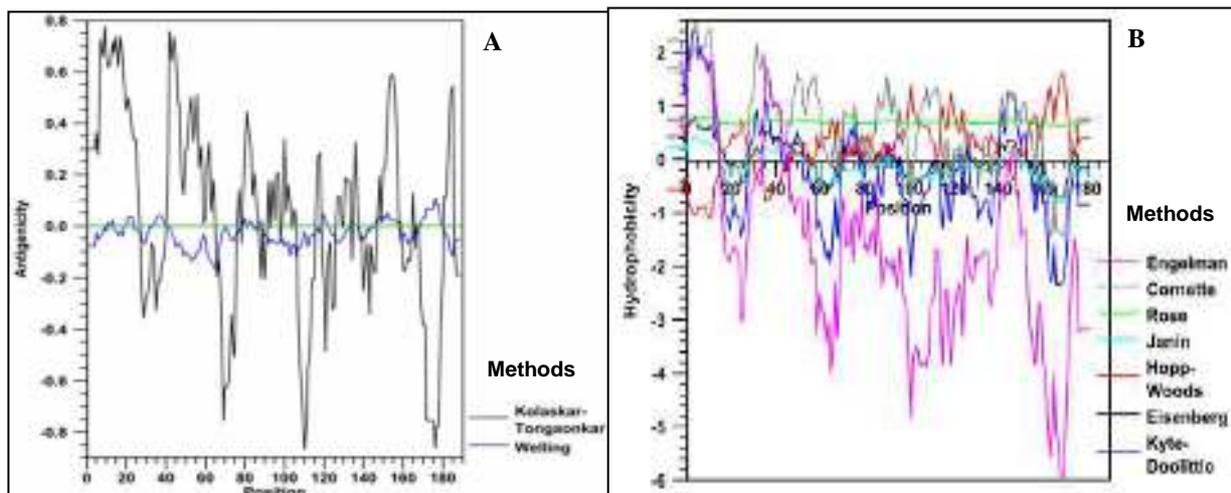
menetapkan lokasi dan runutan peptida yang diperkirakan imunogenik. Hasil analisis penentuan epitop untuk sel B menggunakan BepiPred 1.0 diketahui bahwa dalam urutan peptida GRA1 secara linier memiliki 7 tapak yang imunogenik seperti tercantum pada Tabel 3. Sebaliknya analisis menggunakan CTL Epitope Finder 1.1 ternyata diperoleh 6 tapak antigenik-imunogenik yang diperkirakan dapat dikenali sebagai epitop oleh *Cytotoxic lymphocyte* (CTL/Limfosit T sitotoksik/CD8⁺). Epitop adalah struktur atau bagian yang imunogenik dari suatu molekul protein atau antigen.

PEMBAHASAN

Setiap protein memiliki susunan asam amino yang unik dan khas. Susunan asam amino dalam suatu protein tidak hanya akan menentukan struktur tiga dimensi dan fungsionalitasnya dalam sistem biologis tetapi juga menentukan karakter fisika dan kimiawi dari masing-masing protein. Salah satu karakter fisikokimia dari protein adalah berat molekul dan titik isoelektrik yang sangat bermanfaat untuk identifikasi protein pada elektroforesis dimensi tunggal ataupun ganda (IEF). Hal ini perlu dipahami sebab identifikasi protein *Toxoplasma gondii* dengan elektroforesis dimensi tunggal harus diterjemahkan

secara hati-hati mengingat beberapa jenis protein yang berbeda seringkali memiliki berat molekul yang sama sehingga akan tervisualisasi sebagai satu pita protein pada gel poliakrilamid. Beberapa contoh protein yang memiliki berat molekul sama adalah protein GRA3 dan SAG1 ataupun GRA1 dengan SAG2 yang memiliki berat molekul (BM) sangat dekat atau hampir sama (Cesbron-Delauw *et al.*, 1996; Tomavo, 1996). Oleh sebab itu, elektroforesis yang paling akurat dan direkomendasi adalah menggunakan elektroforesis dimensi ganda (2D *electrophoresis* atau *IEF, isoelectrofocusing*). Hal ini disebabkan karena teknik elektroforesis dimensi ganda mampu memisahkan suatu protein dalam poliakrilamid gel berdasarkan BM dan titik isoelektriknya.

Setiap asam amino memiliki massa dan muatan listrik tertentu. Asam amino pada dasarnya tersusun atas atom C, H, O dan N yang memiliki masa atom dan memiliki muatan elektron. Secara umum, dalam larutan dengan pH netral, asam amino memiliki bentuk *zwitterion* atau bentuk ion dipolar. Pada bentuk ion dipolar tersebut gugus amino dari asam amino mengalami protonasi ($-\text{NH}_3^+$) dan gugus karboksilnya mengalami disosiasi ($-\text{COO}^-$). Apabila asam amino tersebut berada dalam larutan yang



Gambar 4. Hasil analisis antigenisitas dan hidrofobisitas dengan CBPW 3.0: **A.** Analisis antigenisitas **B.** Analisis hidrofobisitas. Nilai skala negatif menunjukkan regio yang bersifat hidrofilik dan antigenik. Nilai skala positif menunjukkan regio yang bersifat hidrofobik.

bersifat asam, maka gugus karboksilnya tetap tidak terionisasi (-COOH). Sementara gugus aminonya akan mengalami ionisasi menjadi " $-\text{NH}_3^+$ ", sehingga asam amino tersebut bermuatan positif (Stryer, 1998). Demikian pula sebaliknya jika asam amino tersebut berada pada larutan yang bersifat alkalis.

Berdasarkan sifat dan prinsip tersebut, protein yang tersusun atas berbagai jenis asam amino dengan muatan listrik yang berbeda dapat diidentifikasi pada titik isoelektriknya. Titik isoelektrik merupakan suatu keadaan dimana protein memiliki muatan listrik sama dengan atau mendekati nol pada pH tertentu (Stryer, 1998). Hal demikian dapat dipahami karena dengan berubahnya pH, maka muatan listrik masing-masing asam amino penyusun protein (dalam hal ini GRA1) akan berubah. Perubahan akan terus berlangsung sampai pada pH tertentu akan terjadi keseimbangan muatan diantara asam amino penyusun protein tersebut sehingga total muatan listriknya menjadi nol atau mendekati nol.

Pada analisis dengan menggunakan CLC Bio Protein, diketahui bahwa protein GRA1 memiliki BM 20,159kD dengan titik isoelektrik 4,43 (Gambar 2). Kalkulasi mengenai berat molekul dilakukan dengan menghitung total masa atom penyusun polipeptida dari protein GRA1 yang didasarkan pada sekuen peptida seperti terdeskripsi dalam Gambar 1 dan Tabel 1. Berdasar pada berat molekulnya, maka diketahui bahwa protein GRA1 diperkirakan memiliki antigenitas yang baik tetapi kurang imunogenik. Tizard (2000) menyatakan bahwa suatu protein dengan berat 670 kD (misalnya hemocyanin) merupakan antigen yang poten dan menginduksi respon imun dengan baik (imunogenik). Diketahui bahwa protein dengan berat 69 kD (misalnya albumin) merupakan antigen yang cukup baik tetapi juga dapat menginduksi toleransi respon imun. Sebaliknya protein dengan berat molekul diatas 1 kD (misalnya angiotensin, 1 kD) merupakan antigen yang lemah, sedangkan kurang dari 1 kD diperkirakan tidak antigenik.

Hidrofilisitas, Tapak Antigenik dan Imonogenik Protein GRA1

Asam amino, selain memiliki masa dan muatan listrik juga memiliki sifat kelarutan terhadap

air (polaritas). Beberapa asam amino memiliki sifat non polar (hidrofobik) seperti alanin, fenilalanin, glisin dan lainnya, sebagian lainnya memiliki sifat polar (hidrofilik) seperti misalnya sistein, serin, treonin dan lain lain. Derajat polaritas masing masing asam amino sangat berbeda beda. Berdasarkan analisis terhadap hidrofobisitas – hidrofilisitas susunan asam amino dari suatu protein dapat diperkirakan domain transmembran dan tapak antigeniknya. Tapak antigenik sangat bermanfaat untuk mengetahui apakah klon protein yang diperoleh memiliki potensi sebagai antigen maupun imunogen.

Penentuan antigenitas suatu molekul dapat dilakukan dengan dua pendekatan, pertama secara konseptual dari sisi imunologi dan kedua, dari sisi analisis bioinformatik. Pada pendekatan imunologis, suatu molekul akan memiliki potensi antigenik jika memiliki sifat asing (*foreignness*) bagi tubuh, memiliki berat molekul diatas 1 kD, memiliki struktur kompleks (bukan urutan berulang seperti polisakarida) dan memiliki stabilitas molekul (Tizard, 2000). Berdasarkan kriteria ini dan analisis yang telah diuraikan sebelumnya, maka diketahui bahwa GRA1 adalah molekul asing atau antigenik berdasarkan fakta karena berasal dari *T.gondii* (bukan bagian dari tubuh suatu makhluk itu sendiri), dengan struktur kompleks (terdiri atas 18 asam amino, Lihat Tabel 1) serta memiliki berat molekul 20,16 kD.

Adapun analisis antigenitas dari sudut pandang kedua, yaitu dengan pendekatan bioinformatik untuk menentukan lokasi hidrofobisitas dan hidrofilisitas dari urutan asam amino. Hal ini diperlukan karena suatu bagian antigenik yang diduga dapat memicu respon imun haruslah berada pada bagian permukaan molekul yang dapat terekspos oleh komponen sistem imun yang larut dalam plasma darah atau cairan jaringan. Apabila suatu bagian dari molekul dapat terekspos dipermukaan, maka komponen sistem imun diharapkan dapat mengenali bahan atau molekul asing tersebut. Bagian dari suatu molekul yang bersifat hidrofilik menunjukkan bahwa bagian tersebut merupakan domain permukaan yang dapat

Tabel 3. Lokasi dan Runutan Peptida dari Epitop yang Dikenali oleh Limfosit B maupun Limfosit T Sitotoksik/CD8⁺

Fr No	aa awal	aa akhir	Sekuen Epitop untuk CD8 ⁺	aa awal	aa akhir	Sekuen Epitop untuk Limfosit B
1	18	26	LSAGAYAAE	23	37	YAAEGGDNQSSAVSD
2	23	31	YAAEGGDNQ	47	56	GGTGQGLGIG
3	52	60	GLGIGESVD	68	78	YRVERPTGNPD
4	94	102	VGNVNVEEV	86	97	ASDGSYSEVGNV
5	109	117	MQRDEDIFL	108	111	SMQR
6	152	160	SAVASVVQD	123	142	GETVEEAIEDVAQAEGLNSE
7				170	179	QLEKDKQQLK

Keterangan: FR No = Fragmen peptida nomor ke -. aa = asam amino. CD8⁺ adalah limfosit T sitotoksik (CTL, *cytotoxic lymphocyte*). aa awal ataupun aa akhir : menunjukkan posisi awal dan akhir asam amino tersebut dalam sekuen protein GRA1.

terekspos (*surface-exposed domain*) sehingga diperkirakan memiliki potensi antigenik. Potensi tersebut didasarkan pada pemikiran bahwa wilayah tersebut mudah diakses oleh komponen sistem imun.

Berdasarkan analisis dengan BioEdit menggunakan skala Hoop-Woods, diperkirakan protein GRA1 memiliki sekitar 9 tapak antigenik (Gambar 3). Skala Hoop-Woods (*Hoop-Woods scale*) sesuai untuk determinasi tapak atau lokasi antigenik pada suatu protein (Hoop dan Woods, 1983). Sebaliknya dengan program CBPW 3.0 menggunakan metoda Kolaskar-Tongaonkar maupun metoda Welling diperkirakan terdapat 6 – 7 tapak antigenik (Gambar 4A). Analisis antigenisitas menggunakan metoda Welling yang memiliki akurasi lebih baik dibanding skala Hoop-Woods (Welling *et al.*, 1985). Sebaliknya metoda Kolaskar-Tongaonkar bersifat semi empiris dan dilaporkan memiliki akurasi 75% (Kolaskar dan Tongaonkar, 1990).

Hasil analisis dengan skala Hoop-Woods pada CBPW 3.0 (Gambar 4B) ternyata memiliki hasil yang agak berbeda dengan analisis skala Hoop-Woods pada BioEdit (Gambar 3) maupun dengan 5 metoda algoritma lainnya (Gambar 4B). Perbedaan tersebut kemungkinan terkait dengan perbedaan *window size* yang digunakan. Sebaliknya hasil

analisis antigenisitas dengan metoda Kolaskar-Tongaonkar maupun metoda Welling (Gambar 4A) lebih bersesuaian dengan hasil analisis hidrofilitas-hidrofobitas menggunakan 5 metoda algoritma lainnya yaitu metoda Engelman, Kyte-Doolittle, Janin, Eisenberg dan Cornette (Gambar 4B).

Namun demikian analisis tersebut hanya menunjukkan lokasi runutan asam amino yang hidrofilik dan berpotensi antigenik karena mudah terekspos sehingga dapat dikenali sistem imun. Suatu molekul protein yang memiliki bagian atau fragmen antigenik belum tentu imunogenik. Antigenik mengacu pada keasingan suatu molekul dan tapak antigenik mengacu pada fragmen / bagian yang dikenali dan terekspos sistem imun. Adapun Imunogenik mengacu pada kemampuan molekul itu sendiri dalam menginduksi/menstimulasi sistem imun untuk membangkitkan respons kebal / respon imun. Oleh sebab itu perlu diprediksi bagian manakah yang imunogenik (mampu menginduksi sistem imun), baik yang terkait dengan pengenalan oleh limfosit T ataupun limfosit B.

Hal yang perlu dipahami bahwa imunogenisitas tidak selalu harus bersifat hidrofilik, tetapi juga bagian yang bersifat hidrofobik. Imunogen yang hidrofilik umumnya cenderung terkait dengan sel fagositik maupun limfosit B yang

menghasilkan antibodi. Hal ini disebabkan karena lokasinya yang berada pada permukaan molekul (*surface exposed domain*). Sel fagositik dan limfosit B memerlukan petanda antigenik berupa determinan konformasi dipermukaan dari suatu molekul untuk dapat dikenali dan difagositosis. Demikian pula halnya dengan antibodi yang disekresikan oleh limfosit B.

Selanjutnya sel fagositik yang telah melakukan fagositosis akan mendegradasi molekul antigenik tersebut menjadi beberapa fragmen peptida. Fragmen-fragmen peptida tersebut akan dipresentasikan dipermukaan sel fagositik melalui molekul MHC. Sel fagositik demikian ini disebut sebagai (APC, *antigen presenting cell*) atau sel penyaji antigen (Abbas *et al.*, 2010). Fragmen peptida yang ditampilkan dipermukaan sel oleh molekul MHC tersebut akan disajikan pada limfosit T untuk direspon, baik limfosit T pembantu/CD4⁺ maupun sel T sitotoksik/CD8⁺/CTL. Fragmen peptida tersebut tidak harus selalu bagian yang hidrofilik dari suatu molekul, tetapi juga dapat berasal dari bagian yang hidrofobik. Oleh sebab itu bagian yang hidrofobik juga dapat menginduksi respon imun berperantara sel yang diperankan limfosit T.

Penentuan epitop yang dapat dikenali CTL umumnya memiliki panjang peptida terbatas yaitu sekitar 9 peptida. CTL/sel T sitotoksik/CD8⁺ dalam imunologi dikenal sebagai sel yang berperan dalam respon imun berperantara sel (*cellular mediated immunity* = CMI). Hal tersebut sangat krusial pada organisme obligat intraseluler seperti halnya *T.gondii*. CD8⁺ berperan dominan disamping respon imun humoral yang mengarah pada proinflamatorik (Denkers dan Gazinelli, 1998; Prigione *et al.*, 2000; Subekti dan Arrasyid, 2006; Subekti *et al.*, 2006). Adanya tapak antigenik dan epitop untuk CD8⁺ mengindikasikan bahwa protein GRA1 tidak hanya antigenik tetapi juga imunogenik yang akan dapat menginduksi respon imun seluler.

Pada protein GRA1, terdapat 6 epitop yang dapat dikenali oleh limfosit T sitotoksik (Tabel 3). Dua dari enam epitop tersebut merupakan fragmen peptida yang bersifat hidrofobik. Hal ini menunjukkan bahwa area tersebut tidak berlokasi

pada daerah permukaan yang mudah terakses oleh sistem imun (*non surface exposed domain*). Penentuan hidrofobisitas fragmen nomor 4 dan 5 dilakukan dengan mencocokkannya dengan hasil analisis hidrofobisitas seperti diperlihatkan pada Gambar 4B. Fenomena tersebut dapat dipahami karena stimulasi limfosit T dilakukan oleh sel penyaji antigen yang mempresentasikan fragmen peptida di permukaan selnya melalui molekul MHC I ataupun MHC II. Fragmen peptida tersebut hasil fagositosis dan pengolahan (degradasi) dari suatu molekul protein ataupun berbagai struktur penyusun mikroorganisme yang tidak dipengaruhi hidrofobisitas maupun hidrofilitas.

Aktivasi limfosit B diperantari oleh ikatan antigen – IgM terikat membran sel (*IgM bearing membrane*) pada permukaan limfosit B (Abbas *et al.*, 2010). Berikutnya dinyatakan bahwa setelah teraktivasi, limfosit B akan berdeferensiasi menjadi sel plasma dan mensekresikan antibodi, baik berupa IgM yang tersekresi, IgG maupun IgA. Semua klas antibodi yang dihasilkan tersebut (IgM, IgG atau IgA) juga akan mengenali epitop yang sama dengan epitop yang menginduksi aktivasi limfosit B. Epitop tersebut adalah bagian hidrofilik yang merupakan *surface exposed domain*.

Protein GRA1 diketahui bersifat antigenik dan memiliki tapak antigenik yang hidrofilik sehingga dapat dikenali oleh IgM terikat membran pada permukaan limfosit B. Apabila bagian yang dikenali tersebut mengaktivasi limfosit B untuk menghasilkan antibodi, maka antibodi juga akan mengenali bagian imunogenik (epitop) yang sama dari protein GRA1. Terdapat 7 epitop dari protein GRA1 untuk pengenalan limfosit B (Tabel 3). Seluruh epitop untuk limfosit B tersebut bersifat hidrofilik sesuai dengan Gambar 4B dengan derajat hidrofilitas yang berbeda. Perkiraan urutan hidrofilitas fragmen pada Tabel 3 adalah fragmen peptida nomor $1 = 5 > 3 = 6 = 7 > 2 = 4$.

Epitop untuk limfosit B sangat tergantung dari hidrofilitas fragmennya. Apabila suatu fragmen peptida bersifat hidrofilik, berarti fragmen tersebut berada dibagian permukaan struktur molekul (*surface exposed domain*). Apabila fragmen tersebut

berada dibagian dalam (bukan permukaan) struktur suatu molekul, maka tidak dapat diakses oleh IgM terikat membran pada permukaan limfosit B. Hal ini bermakna bahwa bagian tersebut tidak dapat dikenali dan diakses oleh bagian variabel dari struktur antibodi (*antigen binding site*) dan tidak akan menginduksi ataupun mengaktifasi limfosit B. Hal tersebut mengakibatkan tidak terjadi *switching* menjadi IgM tersekresi, IgG atau IgA yang sangat tergantung oleh pengenalan IgM terikat membran. Oleh sebab itu hidrofilitas juga menjadi salah satu syarat untuk prediksi imunogenisitas fragmen peptida GRA1 terkait dengan limfosit B.

Diantara tapak imunogenik dari fragmen peptida GRA1 yang dikenali oleh limfosit T dan limfosit B hasil prediksi menggunakan CTLEF 1.1 dan BepiPred 1.0, terdapat hasil yang serupa atau saling tumpang tindih (*overlapping*). Urutan tersebut adalah YAAEGGDNQ (tyr-ala-ala-glu-gly-gly-asp-asn-gln) yang berada pada posisi asam amino ke-23 sampai ke-31. Lokasi tersebut tepat berada disamping lokasi yang diperkirakan sebagai peptida sinyal. Fragmen peptida tersebut merupakan fragmen yang sangat hidrofilik dengan nilai prediksi tertinggi. Hal ini juga terlihat dari Gambar 4A dimana metoda Welling dan Kolaskar –Tongaonkar juga menyatakan wilayah tersebut antigenik. Demikian pula dengan metoda Engelman, Kyte-Doolittle, Janin, Eisenberg dan Cornette pada analisis hidrofobitas (Gambar 4B) yang juga menunjukkan bahwa wilayah tersebut hidrofilik. Dengan demikian secara umum, fragmen dengan runutan peptida YAAEGGDNQ tersebut diperkirakan memiliki potensi antigenik dan imunogenik cenderung lebih kuat dibanding fragmen lainnya.

Determinasi Peptida Sinyal dan Fungsinya

Kelompok protein granula padat (GRA) merupakan protein ekskretori-sekretori (ES) yang dilepaskan oleh organel granula padat (*dense granule*) dari takizoit *T.gondii* setelah berada dalam suatu vakuola yang dibentuk dari hasil invaginasi membran sel inang terinfeksi untuk dimodifikasi menjadi vakuola parasitoforus (Zhou *et al.*, 2005). Modifikasi vakuola parasitoforus (VP) dengan berbagai

kelompok protein GRA bersama dengan protein MIC dan ROP akan mengakibatkan VP tidak dikenali oleh lisosom sehingga tidak dapat dihancurkan.

Oleh karena protein GRA, khususnya GRA1 merupakan protein ekskretori-sekretori, maka diperkirakan memiliki sinyal sekretori dalam struktur polipeptidanya. Identifikasi posisi peptida sinyal protein GRA1 tersebut dilakukan dengan program CBPW 3.0 dan SignalP 3.0. SignalP merupakan program yang digunakan untuk menganalisis ada tidaknya suatu runutan peptida dalam suatu struktur primer protein yang berfungsi sebagai peptida sinyal (Banerjee-Basu dan Baxevanis, 2001). Hasil analisis menunjukkan bahwa peptida sinyal pada protein GRA1 dimulai dari asam amino ke-1 sampai ke-24 (Gambar 6).

Analisis menggunakan program TargetP 1.1 diketahui bahwa peptida sinyal pada protein GRA1 lebih cenderung sebagai sinyal sekretori dibanding sinyal translokasi menuju organel lainnya (Tabel 2). Hal ini memperlihatkan bahwa fragmen yang diduga peptida sinyal pada protein GRA1 ternyata bukan untuk translokasi menuju retikulum endoplasma atau organel lainnya. TargetP merupakan program yang didesain untuk menganalisis fungsi dari peptida sinyal yang umumnya berada pada ujung N-terminus dari suatu sekuen peptida (Emanuelsson *et al.*, 2000). Analisis terhadap pola sekuen dari berbagai peptida sinyal beberapa protein GRA juga tidak memperlihatkan adanya homologi sekuen dengan konsensus pola yang kuat dan tetap (*conserved*) diantara berbagai sinyal protein GRA maupun dibandingkan dengan konsensus pola sekuen untuk sinyal translokasi menuju organel tertentu (hasil analisis tidak ditampilkan). Hal demikian secara tidak langsung bertolak belakang dengan pendapat Cesbron-Delauw *et al.* (1996) yang menyatakan bahwa sinyal yang terdapat pada sekuen peptida protein GRA diduga berkaitan dengan translokasi protein dari ribosom menuju granula padat ataupun translokasi menuju retikulum endoplasma.

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil analisis dengan berbagai program bioinformatika diketahui bahwa protein

GRA1 yang dikloning dari takizoit *T.gondii* isolat lokal memiliki panjang sekuen peptida 190 aa dengan berat molekul protein 20,159 kD serta memiliki titik isoelektrik 4,43. Protein GRA1 juga diketahui memiliki sejumlah tapak antigenik-imunogenik dan diantaranya merupakan epitop yang dapat dikenali oleh sel B maupun sel T sitotoksik/CD8⁺/CTL. Protein GRA1 cenderung memiliki antigenitas yang baik tetapi imunogenitasnya lemah.

DAFTAR PUSTAKA

- Abbas AK, AH Litchman and S Pilai. 2010. *Cellular and Molecular Immunology 6th ed.*, 215–218. Elsevier, Philadelphia.
- Banerjee-Basu S and AD Baxevanis. 2001. *Predictive methods using protein sequences*. In: *Bioinformatics, A Practical Guide to the Analysis of Genes and Proteins*, 272–273. Wiley and Sons Inc.
- Cesbron-Delauw M-F, L Lecordier and C Mercier. 1996. *Role of Secretory Dense Granule Organelles in the Pathogenesis of Toxoplasmosis*. In: *Toxoplasma gondii*, 59-65. Springer Verlag, Berlin.
- Denkers EY and RT Gazzinelli. 1998. Regulation and function of T – cell – mediated immunity during *Toxoplasma gondii* infection. *Clin. Microbiol. Rev.* **11**, 569–588.
- Emanuelsson O, H Nielsen, S Brunak and Gunnar Von Heijne. 2000. Predicting subcellular localization of protein based on their N-terminal amino acid sequence. *J. Mol. Biol.* **300**, 1005–1016.
- Hoop TP and KR Woods. 1983. A computer program for predicting protein antigenic determinants. *Mol. Immunol.* **20** (4), 483–489.
- Kolaskar AS and PC Tongaonkar. 1990. A semi-empirical method for prediction of antigenic determinants on protein antigens. *FEBS Lett.* **276**(1-2), 172–174.
- Prigione I, P Facchetti, L Lecordier, D Deslee, S Chiesa, M-F Cesbron-Delauw and V Pistoia. 2000. T cell clones raised from chronically infected healthy humans by stimulation with *Toxoplasma gondii* excretory – secretory antigens cross – react with live tachyzoites: characterization of the fine antigenic specificity of the clones and implications for vaccine development. *J. Immunol.* **164**, 3741 – 3748.
- Subekti DT dan NK Arrasyid. 2006. Imunopatogenesis *Toxoplasma gondii* berdasarkan perbedaan galur. *Wartazoa* **16**(3), 129–146.
- Subekti DT, NK Arrasyid, WT. Artama dan Marsetyawan HNES. 2006. Efek ajuvan toksin kolera dan enterotoksin Tipe I terhadap profil IgG2a dan IgG2b pada mencit yang diimunisasi intranasal dengan protein solubel *Toxoplasma gondii*. *Med. Ked. Hewan* **22**(1), 10–16.
- Subekti DT, WT Artama, E Sulistyarningsih, SH Poerwanto, Y Sari dan F Bagaskoro. 2008. Kloning dan analisis hasil kloning gen GRA1 dari Takizoit *Toxoplasma gondii* isolat lokal. *JITV* **13**(1), 44–52.
- Stryer L. 1998. *Biochemistry*, 17–74. WH Freeman and Company, New York.
- Tomavo S. 1996. *The Major Surface Proteins of Toxoplasma gondii: Structures and Functions in Toxoplasma gondii*, 45–58. Springer Verlag, Berlin.
- Tizzard IR. 2000. *Veterinary Immunology 6th edition*. WB Saunders Co. Pennsylvania.
- Welling GW, WJ Weijer, R VanderZee and S Welling-Wester. 1985. Prediction of sequential antigenic regions in proteins. *FEBS Lett.* **188**(2), 215–218.
- Zhou XW, BFC Kafsack, RN Cole, P Beckett, RF Shen and VB Carruthers. 2005. The opportunistic pathogen *Toxoplasma gondii* deploys a diverse legion of invasion and survival proteins. *J. Biol. Chem.* **280**, 34233–34244.