

METODE PERBANYAKAN KONTROL POSITIF *Plasmodium* spp. DENGAN KLONING

Lucia Dwi Antika, Sarwo Handayani, Rita Marleta Dewi

Pusat Biomedis dan Teknologi Dasar Kesehatan, Jl. Percetakan Negara No. 29 Jakarta, Indonesia

Email : lucia.dwiantika@gmail.com

MULTIPLICATION OF PLASMODIUM SPP POSITIVE CONTROL BY CLONING METHOD

Abstract

Positive control of Plasmodium spp. is needed in identification of malaria species using Polymerase Chain Reaction (PCR) method. The limitedness of malaria positive control encourages us to develop the cloning method to multiply Plasmodium spp. DNA particularly P.vivax, P. malariae, and P. ovale that are still unable to be cultured continuously. DNA product of single round and nested PCR were used as DNA target for cloning method. The cloning method consisted of several processes which are ligation of DNA target into TOPO vector, transformation into competent Escherichia coli DH5α, and selection of transformation product using selective media. In the end of the process, PCR was done to check the success rate of cloning method. Single round PCR resulting 200-300 bp of DNA product, while nested PCR resulting 100-200 bp of DNA product. The advantages of cloning method are produce large amount of products in such a shorter time in process with just small amounts of sample required. However, compared to continuous culture and blood specimen, DNA produced by cloning process can only be used for a spesific PCR method. Furthermore, other test is still required to examine stability of cloning product.

Keywords: Plasmodium spp., cloning, single round PCR, nested PCR.

ABSTRAK

Keterbatasan kontrol positif untuk pemeriksaan spesies malaria secara molekuler dengan teknik *Polymerase Chain Reaction* (PCR), mendorong kita mencari cara alternatif dengan metode kloning. Metode kloning dilakukan untuk perbanyak DNA *Plasmodium* spp. terutama spesies yang belum dapat dikembangkan secara kultur berkesinambungan. Amplifikasi DNA *Plasmodium* spp. menggunakan metode *single round* dan *nested* PCR yang selanjutnya produk PCR tersebut digunakan sebagai DNA target dalam proses kloning. Proses kloning meliputi ligasi ke dalam TOPO vektor, transformasi ke dalam host *Escherichia coli* DH5α kompeten, dan seleksi hasil transformasi pada media selektif. Selanjutnya dilakukan lagi PCR spesiasi sebagai tahap akhir untuk mengecek keberhasilan kloning. Metode *single round* PCR menghasilkan produk DNA dengan ukuran panjang basa 200-300 bp, sedangkan metode *nested* PCR menghasilkan produk DNA berukuran 100-200 bp. Keuntungan metode kloning adalah dapat menghasilkan produk DNA dengan jumlah banyak dari volume sampel yang sedikit dan waktu yang relatif singkat. Jika dibandingkan dengan DNA parasit dari hasil kultur berkesinambungan, penggunaan DNA hasil kloning sebagai kontrol positif hanya terbatas pada satu metode PCR saja. Selain itu tes lanjutan untuk menguji stabilitas produk kloning juga sangat diperlukan.

Kata kunci: *Plasmodium* spp., kloning, *single round* PCR, *nested* PCR.

PENDAHULUAN

Malaria merupakan salah satu masalah kesehatan di dunia, khususnya di negara dengan iklim tropis seperti Indonesia. Pada tahun 2010, laporan kesehatan dunia menunjukkan terdapat 106 negara yang termasuk dalam negara endemis malaria.¹ Meningkatnya kasus malaria menyebabkan diperlukan metode diagnostik yang cepat dan akurat, salah satu metode yang telah dikembangkan untuk mendiagnosis penyakit malaria adalah metode *Polymerase Chain Reaction* (PCR).² Prinsip metode ini adalah identifikasi dan amplifikasi gen spesifik yang dimiliki oleh *Plasmodium spp.* dengan menggunakan sepasang primer dengan bantuan enzim polimerase untuk diagnosis keberadaannya pada sampel darah pasien.³

Pemeriksaan sampel darah yang diduga mengandung parasit malaria memerlukan keberadaan kontrol positif untuk memastikan keakuratan pemeriksaan. Kontrol positif yang biasa digunakan di Laboratorium Parasitologi, Badan Litbang Kesehatan, Kementerian Kesehatan adalah DNA hasil ekstraksi dari sampel darah yang sudah dipastikan positif mengandung *Plasmodium spp.* berdasarkan pemeriksaan mikroskop sebagai *gold standard* dalam pemeriksaan parasit malaria.

Dalam memperbanyak biakan *Plasmodium falciparum*, telah ditemukan metode kultur secara *in vitro* yang memungkinkan parasit ditumbuhkan di media artifisial RPMI-1640 yang diberikan penambahan serum dan darah manusia. Sedangkan untuk *P. vivax*, *P. malariae*, dan *P. ovale* belum ditemukan kondisi yang optimal untuk memperbanyak parasit menggunakan media artifisial⁴. Penggunaan kontrol positif secara terus-menerus menyebabkan mulai terbatasnya stok kontrol positif, khususnya untuk spesies *Plasmodium* yang sampai saat ini belum dapat diperbanyak dengan metode kultur *in vitro*. Oleh karena itu di Laboratorium Parasitologi, Badan Litbang Kesehatan dikembangkan metode kloning untuk memperbanyak kontrol positif *P. vivax*, *P. malariae* dan *P. ovale* dengan memperbanyak situs DNA spesifik sebagai penanda infeksi malaria.

BAHAN DAN METODE

Kloning merupakan suatu metode yang akan menghasilkan salinan DNA dengan sifat

genetik dan biologis yang sama. Kloning untuk memperbanyak kontrol positif malaria dilakukan dengan beberapa tahap yaitu: PCR spesiasi untuk menentukan *Plasmodium spp.*, visualisasi produk PCR, ekstraksi produk PCR dari gel agarosa, ligasi *deoxyribonucleic acid* (DNA) produk PCR ke TOPO vektor, transformasi plasmid (TOPO vektor) rekombinan ke sel *E.coli* DH5 α kompeten, seleksi koloni *E.coli* transforman pada media Luria Bertani (LB) agar, purifikasi plasmid *E.coli* dan terakhir amplifikasi DNA plasmid dengan spesiasi PCR yang sama dengan awal kloning untuk mengecek hasil.

1. PCR Spesiasi dan Visualisasi

PCR spesiasi menggunakan dua metode yaitu metode *single round* PCR dan metode *nested* PCR. Metode *single round* PCR dikembangkan oleh Marfurt dkk dari *Menzies School of Health Research / MSHR* dan telah digunakan di Laboratorium Parasitologi Badan Litbangkes dengan sedikit modifikasi pada volume reagen dan suhu amplifikasi^{5,6}. Metode *nested* PCR dikembangkan oleh Snounou dkk (1993) yang dimodifikasi oleh Singh dkk (1999) dan dikembangkan juga di Laboratorium Parasitologi Badan Litbangkes dengan sedikit perubahan pada jenis dan volume reagen^{7,8}. Kedua amplifikasi PCR berdasarkan pada ukuran fragmen dari *small subunit* 18S rRNA. Hasil positif dan spesies malaria ditentukan berdasarkan ukuran ampikon yang dihasilkan. Metode *single round* PCR akan menghasilkan produk DNA dengan ukuran panjang basa sekitar 200-300 bp, sementara metode *nested* PCR menghasilkan produk DNA berukuran sekitar 100-200 bp.

Spesiasi dengan single round PCR

Komponen master mix terdiri dari buffer PCR 10x, MgCl₂ 25 mM, Tag DNA polimerase 5U/ μ l (Applied Biosystem-N808024), dNTP 10mM (AB- N8080260) serta primer Pv, Pm, Po, dan revmal (1st base) (Tabel 1) dengan volume total sebanyak 25 μ l⁶. Kondisi PCR yang digunakan pada amplifikasi DNA adalah predenaturasi 95 °C-10 menit, diikuti dengan 43 siklus amplifikasi yang terdiri dari denaturasi 95 °C-45 detik, Annealing 55 °C-90 detik, dan elongasi 72 °C- 5 menit⁵.

Tabel 1. Urutan primer untuk single round PCR dan ukuran produk amplifikasi.

Primer	Segmen Gen (5'®3')	Ukuran Produk
Pv	Forward 5'- CGG CTT GGA AGT CCT TGT -3'	276 bp
Pm	Forward 5'- CGT TAA GAA TAA ACG CCA AGC G -3'	412 bp
Po	Forward 5'- CTG TTC TTT GCA TTC CTT ATG C -3'	375 bp
RevMal	Reverse 5'- GTA TCT GAT CGT CTT CAC TCCC -3'	

Tabel 2. Urutan primer untuk nested PCR tahap pertama dan ukuran produk amplifikasi.

Primer	Segmen Gen (5'®3')	Ukuran Produk
rPLU-1	Forward 5'- TCA AAG ATT AAG CCA AAG TGA -3'	1640 bp
rPLU-5	Reverse 5'- CCT GTT GTT GCC TTA AAC TTC -3'	
rVIV-1	Forward 5'- CGC TTC TAG CTT AAT CCA CAT AAC TGA TAC -3'	117 bp
rVIV-2	Reverse 5'- ACT TCC AAG CCG AAG CAA AGA AAG TCC TTA -3'	
rMAL-1	Forward 5'- ATA ACA TAG TTG TAC GTT AAG AAT AAC CGC -3'	144 bp
rMAL-2	Reverse 5'- AAA ATT CCC ATG CAT AAA AAA TTA TAC AAA -3'	

Spesiasi dengan nested PCR

Identifikasi *Plasmodium* spp. dengan *nested* PCR melalui 2 kali tahap PCR. PCR tahap pertama digunakan untuk mengidentifikasi genus *Plasmodium*, sedangkan PCR tahap kedua (*nested*) digunakan untuk mengidentifikasi *Plasmodium* spp.. Komposisi reagen PCR tahap 1 adalah 12,5 µl Gotag green master mix (Promega-7122) ditambah 2,5 µl primer rPLU-1 dan rPLU-5 (Sigma), 1 µl DNA sample serta *nuclease free water* (NFW) hingga volume akhir 25 µl. Sedangkan komposisi reagen PCR tahap 2 terdiri 12,5 µl Gotag green master mix (Promega-7122), 2 µl primer rVIV-1, rVIV-2, rMAL-1 dan rMAL-2 (1st base) dengan konsentrasi 2.5 mM, 2 µl produk PCR tahap pertama, dan NFW hingga mencapai volume total 20 µl^{7,8}. Sekuen primer yang digunakan pada PCR tahap pertama dan kedua serta ukuran produk amplifikasi dengan metode nested PCR disajikan pada Tabel 2.

Tabel 3. Kondisi PCR tahap pertama dengan metode nested PCR.

Tahap	Suhu	Waktu	
Pre-denaturasi	94 °C	4 menit	
Denaturasi	94 °C	1 menit	
Annealing	55 °C	1 menit	30 siklus
Elongasi	72 °C	2 menit	
Post-elongasi	72 °C	5 menit	
Hold	4 °C		

Tabel 4. Kondisi PCR tahap kedua dengan metode nested PCR.

Tahap	Suhu	Waktu	
Pre-denaturasi	94 °C	4 menit	
Denaturasi	94 °C	30 detik	
Annealing	58 °C	1 menit	
Elongasi	72 °C	45 detik	45 siklus
Post-elongasi	72 °C	5 menit	
Hold	4 °C		

Visualiasi produk PCR

Produk PCR dipisahkan berdasarkan ukuran basa menggunakan *gel ultrapure™ agarose* (Invitrogen) 2% (b/v) yang telah ditambah etidium bromida (EtBr) 3 µl/100 ml buffer *Tris-Acetate EDTA-1x* (TAE-1x). DNA di dalam gel kemudian dijalankan pada voltase 100 volt selama 35 menit. Hasil DNA yang telah dipisahkan divisualisasikan di bawah sinar UV menggunakan *gel doc* (Biorad) disertai dengan penanda ukuran panjang basa/*ladder* (Invitrogen)

2. Ekstraksi Gel

Setelah hasil elektroforesis PCR spesiasi divisualisasi, pita DNA kemudian dipotong menggunakan *cutter* steril, selanjutnya diekstraksi menggunakan *Purelink™: Quick Gel Extraction Kit* (Invitrogen- K210010). Prosedur ekstraksi gel sesuai dengan protokol pada kit ekstraksi yang digunakan⁹.

3. Transformasi TOPO vektor ke *Escherichia coli* DH5α kompeten

DNA hasil ekstraksi dari gel ditransformasikan ke *One Shot Chemically Competent E.coli* DH5α™-Ti dengan perantara TOPO vektor. Penyisipan DNA hasil purifikasi ke dalam TOPO vektor dengan menggunakan TOPO TA *Cloning Kit* (Invitrogen-450641). Komposisi reaksi kloning TOPO terdiri dari 4 µl DNA, 1 µl larutan garam, 1 µl TOPO vektor yang dicampurkan dalam vial dan diinkubasi selama 5 menit pada suhu ruang (22-23 °C), kemudian diletakkan di atas es. Sebanyak 2 µl reaksi kloning TOPO ditambahkan ke tabung vial yang berisi *E. coli* DH5α kompeten tanpa diaduk, selanjutnya diinkubasi di atas es selama 30 menit. Proses *heat shock* dilakukan pada suhu 42 °C selama 30 detik, kemudian tabung vial dipindahkan kembali di atas es. Sebanyak 250 µl SOC medium ditambahkan ke dalam tabung vial dan dilanjutkan dengan proses inkubasi pada suhu 37 °C menggunakan *rotary shaker* dengan kecepatan 200 rpm selama 1 jam.

4. Seleksi *Escherichia coli* transforman pada media LB Agar

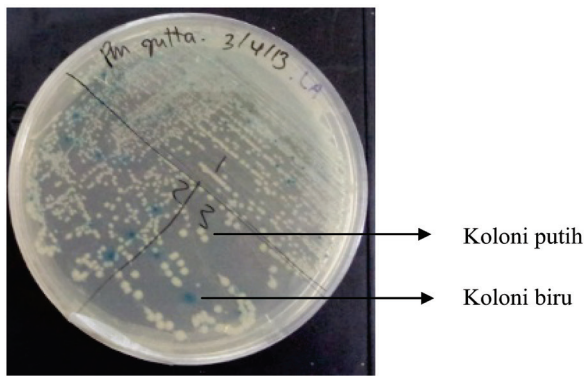
Escherichia coli DH5α kompeten hasil transformasi yang telah diinkubasi selama 1 jam disebar pada 3,2% *prewarmed selective* agar (b/v) yang telah ditambah antibiotik kanamisin (50 µg/ml), dan substrat *ultra pure™ 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactoside* (X-gal) 40 mg/ml (Invitrogen-15520-034) yang sebelumnya telah dilarutkan dalam *dimethyl sulfoxide* (DMSO). *E.coli* hasil transformasi disebar dengan volume 10-50 µl pada media LB agar (Invitrogen-22700-025) untuk mendapatkan koloni dengan penyebaran yang merata. Plate agar yang telah diinokulasi diinkubasi pada suhu 37 °C selama 24 jam. Koloni yang berwarna putih dipilih untuk ditumbuhkan pada media LB cair dan diinkubasi pada suhu 37 °C di *rotary shaker* dengan kecepatan 2000 rpm selama 24 jam. Waktu inkubasi pada media LB yang terlalu lama dapat menyebabkan tingginya angka produk (*yield*) suspensi bakteri dan dapat menyebabkan hasil yang kurang baik pada proses PCR.

5. Purifikasi plasmid

Escherichia coli yang telah diperbanyak dalam media LB cair dipurifikasi untuk mendapatkan plasmid yang membawa target DNA *Plasmodium* spp.. Purifikasi plasmid menggunakan *PureLink™: Quick Plasmid Miniprep Kit* (Invitrogen-K2100-10). Metode purifikasi plasmid sesuai dengan protokol yang terdapat pada kit¹⁰. Plasmid DNA yang telah dipurifikasi diamplifikasi menggunakan metode *single round* PCR dan *nested* PCR untuk mengecek hasil kloning yang nantinya akan digunakan sebagai kontrol positif spesies *Plasmodium* spp. yaitu *P. vivax*, *P. malariae* dan *P. ovale*.

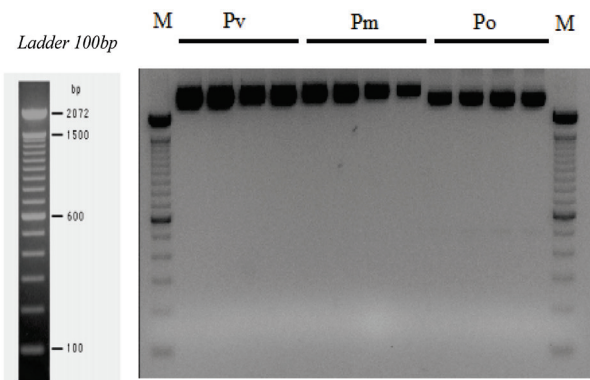
HASIL

Keberhasilan transformasi dapat diketahui dengan tumbuhnya koloni sel *E. coli* berwarna putih pada media LB agar. Sedangkan koloni *E. coli* yang berwarna biru menunjukkan bahwa plasmid yang masuk ke dalam bakteri tidak mengandung gen yang disisipkan. Hasil transformasi plasmid yang mengandung gen *P. malariae* tampak pada Gambar 1.



Gambar 1. Seleksi koloni sel *E coli* DH5α dengan metode seleksi biru-putih pada *P. malariae*.

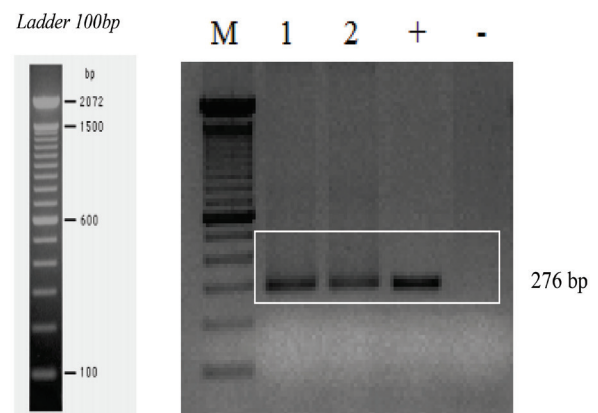
Untuk mengetahui keberhasilan transformasi vektor plasmid ke sel *E. coli* DH5α maka dilakukan ekstraksi DNA plasmid dan elektroforesis pada agarose 2%. Gambar 2 menunjukkan visualisasi plasmid hasil kloning pada *P. vivax*, *P. malariae* dan *P. ovale* dengan metode *single round* PCR. Plasmid diperoleh dari 4 koloni yang masing-masing diperbanyak dalam 1 tabung. Hasil visualisasi menunjukkan adanya plasmid hasil kloning dengan ukuran panjang basa lebih dari 3000 bp.



Gambar 2. Visualisasi plasmid hasil kloning dengan metode *single round* PCR pada gel agarosa 2% (M: ladder 100 bp, Pv: *P. vivax*, Pm: *P. malariae*, Po: *P. ovale*).

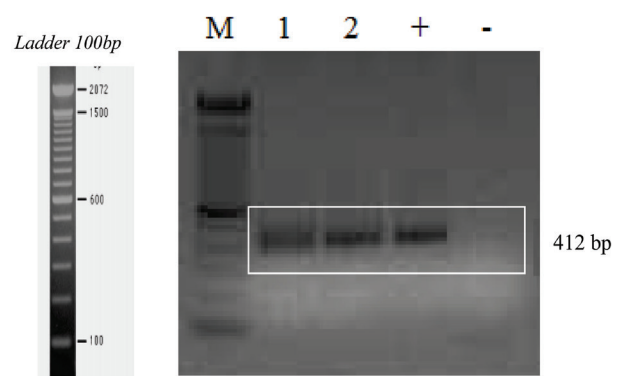
Untuk memastikan hasil kloning mengandung gen sub unit 18s-rRNA, maka dilanjutkan pemeriksaan spesies *Plasmodium* dengan metode PCR baik *single round* PCR maupun *nested* PCR. Hasil visualisasi kloning gen sub unit 18s-rRNA *P.*

vivax dengan metode *single round* PCR tampak pada gambar 3. Hasil positif *P. vivax* bila menunjukkan pita dengan ukuran 276 bp.

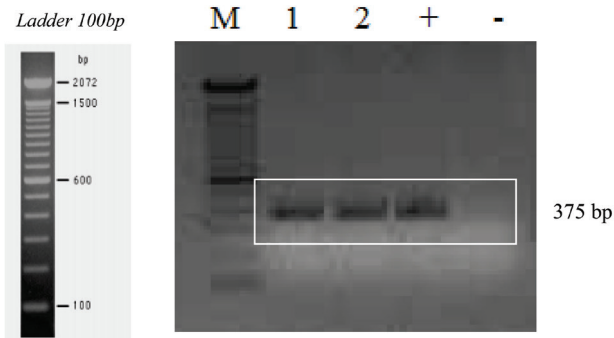


Gambar 3. Visualisasi kloning gen sub unit rRNA pada *P. vivax* dengan metode *single round* PCR pada gel agarosa 2% (M: Ladder 100 bp; 1&2: hasil kloning *P.vivax* tabung 1&2; +: kontrol positif *P.vivax*; -: kontrol negatif).

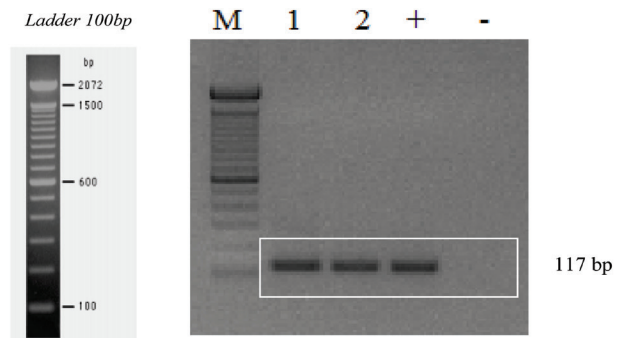
Gambar 4 dan 5 menunjukkan hasil visualisasi kloning gen sub unit rRNA pada *P. malariae* dan *P. ovale* dengan metode *single round* PCR. Hasil positif menunjukkan pita berukuran 412 bp untuk *P. malariae* dan 375 bp untuk *P. ovale*.



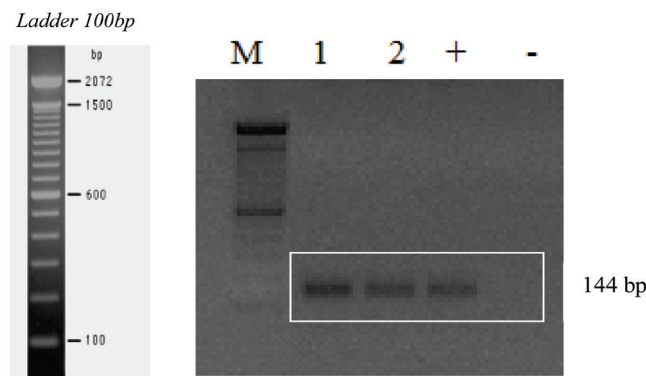
Gambar 4. Visualisasi kloning gen sub unit rRNA pada *P. malariae* dengan metode *single round* PCR pada gel agarosa 2%. (M: Ladder 100 bp; 1&2: hasil kloning *P.malariae* tabung 1&2; +: kontrol positif *P.malariae*; -: kontrol negatif).



Gambar 5. Visualisasi kloning gen sub unit rRNA pada *P. ovale* dengan metode *single round* PCR pada gel agarosa 2%. (M: Ladder 100 bp; 1&2: hasil kloning *P.ovale* tabung 1&2; +: kontrol positif *P.ovale*; -: kontrol negatif).



Gambar 6. Visualisasi kloning gen sub unit rRNA pada *P. vivax* dengan metode *nested* PCR pada gel agarosa 2%. (M: Ladder 100 bp; 1&2: hasil kloning *P.vivax* tabung 1&2; +: kontrol positif *P.vivax*; -: kontrol negatif).



Gambar 7. Visualisasi kloning gen sub unit rRNA pada *P. malariae* dengan metode *nested* PCR pada gel agarosa 2%. (M: Ladder 100 bp; 1&2: hasil kloning *P.malariae* tabung 1& 2; +: kontrol positif *P.malariae*; -: kontrol negatif).

Sedangkan dengan metode *nested* PCR visualisasi gen sub unit rRNA menunjukkan hasil positif pada ukuran 117 bp untuk *P. vivax* dan 144 bp untuk *P. Malariae*, seperti yang tampak pada Gambar 6 dan 7.

PEMBAHASAN

Dalam mendeteksi malaria secara molekuler menggunakan teknik PCR dibutuhkan kontrol positif, sehingga untuk pemeriksaan *Plasmodium spp.* yang rutin memerlukan stok kontrol positif yang cukup. Dari kelima spesies

tersebut, yang telah berhasil dikembangkan secara *in vitro* dengan metode kultur berkesinambungan hanya *P. falciparum*. Metode kloning dipilih untuk perbanyakan kontrol positif *Plasmodium spp.* terutama yang belum dapat dibiakkan secara kultur berkesinambungan dan kasus pun jarang ditemukan seperti *P. malariae* dan *P. ovale*.

Pada proses kloning, tahap penyisipan DNA target ke dalam plasmid dan *E.coli* dengan metode *heat shock* merupakan tahap yang krusial, sehingga waktu dan suhunya harus sangat diperhatikan. DNA target yang disisipkan ke

dalam plasmid TOPO vektor sendiri merupakan bagian dari gen *small subunit* 18s-rRNA yang biasa digunakan untuk mengetahui keragaman *Plasmodium* spp. karena sifatnya yang *conserved* pada tiap spesies. Setelah proses *heat shock*, bakteri ditumbuhkan dalam media SOC pada suhu 37 °C yang merupakan kondisi optimum pertumbuhan untuk bakteri *E.coli*. Kultur bakteri kemudian disebar dan ditumbuhkan dalam media selektif yang telah diberikan penambahan antibiotik kanamisin dan substrat X-gal.

Adanya *Open Reading Frame* (ORF) resistensi antibiotik kanamisin pada basa nomor 1319-2113 dalam peta plasmid TOPO vektor menyebabkan *E.coli* DH5 α yang membawa plasmid rekombinan akan dapat tumbuh pada media selektif yang telah diberi penambahan antibiotik kanamisin. Substrat X-gal yang ditambahkan pada media LB agar dan kanamisin bertujuan untuk menyeleksi apakah *E.coli* DH5 α yang membawa plasmid rekombinan mengandung insert DNA target yang diinginkan. Pada proses kloning ini, X-gal berfungsi untuk mengetahui tereksresi atau tidaknya enzim β -galaktosidase, dengan metode yang biasa disebut seleksi biru-putih¹¹.

Metode ini merupakan metode *screening* untuk mengetahui keberhasilan proses kloning. TOPO vektor membawa segmen pendek dari *E.coli* termasuk sekuens regulator yang mengkodekan informasi 146 asam amino pertama dari β -galaktosidase. β -galaktosidase dikodekan oleh gen *LacZ* yang terdapat pada operon *lac* di dalam TOPO vektor¹¹. Dalam metode *screening* ini, *host* bakteri merupakan mutan delesi *lacZ* (*lacZ* Δ M15), sementara plasmid vektor membawa sekuens *lacZ* α . Dalam keadaan normal, kedua fragmen pada *host* bakteri dan plasmid vektor berada dalam keadaan non-aktif. Namun asosiasi keduanya akan menghasilkan bentuk protein aktif β -galaktosidase. Bentuk komplementasi ini disebut α -complement¹². *Host E.coli* transforman yang membentuk α -complement ini akan mengaktifkan β -galaktosidase yang dapat memecah substrat kromogenik X-gal pada media LA+kanamisin dan akan menghasilkan koloni berwarna biru¹³. Namun dalam proses kloning, penyisipan insert DNA target pada situs poli-kloning di vektor kloning akan menyebabkan tidak terbentuknya α -complement

dan β -galaktosidase tetap dalam keadaan inaktif. Sehingga *E.coli* transforman yang membawa plasmid rekombinan akan tumbuh pada media dan membentuk koloni berwarna putih¹¹.

Plasmid TOPO vektor dipurifikasi dari suspensi bakteri dan kemudian dielektroforesis untuk dicek keberhasilannya. Keberhasilan transformasi plasmid TOPO vektor ke dalam bakteri *E.coli* ditandai dengan munculnya pita DNA berukuran $\pm$ 3,9 kbp yang posisinya terletak diatas band marker. Keberhasilan proses kloning ditandai dengan adanya pita DNA target yang dibandingkan dengan kontrol positif untuk tiap spesies. DNA target adalah gen 18s-rRNA yang merupakan salah satu RNA struktural dalam *small subunit* ribosom dari eukariotik. Hasil kloning dengan metode *single round* PCR menghasilkan basa DNA dengan ukuran 276 bp untuk *P.vivax*, 412 bp pada *P. malariae*, dan 375 bp pada *P. ovale*. Sedangkan dengan metode *nested* PCR menghasilkan basa DNA berukuran 117 bp pada *P. vivax* dan 144 bp pada *P. malariae*. *Small subunit* 18s-rRNA merupakan gen yang banyak digunakan untuk studi filogenetik dan sebagai target random reaksi PCR dalam *screening* keanekaragaman spesies *Plasmodium* spp.¹⁴. Teknik kloning yang dioptimasi di lab parasitologi Badan Litbangkes ini pada prinsipnya sama dengan teknik serupa yang dikembangkan beberapa peneliti mancanegara yaitu dengan menggunakan bakteri sebagai *host* untuk perbanyakannya. Beberapa penelitian lain menggunakan gen yang berbeda sebagai target kloning sesuai dengan tujuan yang ingin didapatkan antara lain kloning pada gen *circumsporozoite* (CS) protein dari *Plasmodium* spp. untuk studi mengenai pengembangan antibodi monoklonal^{15,16}.

Metode kloning untuk perbanyakkan kontrol positif dapat digunakan untuk semua *Plasmodium* spp., ini sangat menguntungkan jika dibandingkan dengan perbanyakkan menggunakan metode kultur yang hingga saat ini hanya dapat digunakan untuk perbanyakkan *P. falciparum*. Selain itu metode kloning hanya menggunakan jumlah sampel yang sedikit dan waktu yang lebih singkat namun dapat menghasilkan produk kloning dengan jumlah yang banyak, jika dibandingkan dengan metode kultur yang harus dilakukan secara berkesinambungan. Bahan yang digunakan pun

lebih mudah didapat karena sudah banyak dijual dalam bentuk produk komersial. Namun masih ada beberapa keterbatasan dari perbanyakan DNA dengan metode kloning dibandingkan dengan metode kultur dan penggunaan spesimen darah penderita malaria salah satunya adalah DNA produk kloning hanya dapat digunakan untuk keperluan tertentu dengan metode tertentu. Selain itu masih perlu dilakukan tes lanjutan untuk menguji stabilitas DNA hasil kloning.

KESIMPULAN

Metode kloning dapat digunakan sebagai alternatif untuk mengatasi keterbatasan kontrol positif dalam pemeriksaan spesies parasit malaria secara molekuler. Metode ini cukup menguntungkan karena volume sampel yang dibutuhkan lebih sedikit, waktu lebih singkat dengan produk yang lebih banyak. Meskipun dengan keterbatasan bahwa kontrol positif tersebut hanya dapat digunakan untuk satu metode pemeriksaan saja. Uji lanjut masih diperlukan untuk mengetahui stabilitas DNA *Plasmodium spp.* hasil kloning.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih kepada drs. Ondri Dwi Sampurno, Apt., M.Sc dari pusat BTDK Badan Litbangkes yang telah memberikan kesempatan untuk melakukan optimasi teknik kloning ini. Terima kasih juga kepada Jutta Marfurt, PhD dari MSHR Darwin Australia dan Prof Balbir Singh dari UNIMAS, Sarawak Malaysia yang telah mengajarkan teknik *single round* dan *nested PCR* untuk identifikasi spesies malaria.

DAFTAR RUJUKAN

1. World Health Organization [WHO]. 2013. Malaria. http://www.who.int/malaria/world_malaria_report_2010/worldmaliareport2010.pdf [terhubung berkala]. 14 Mei 2013.
2. Johnston SP, Pieniazek NJ, Xayavong NJ, Slemenda SB, Wilkins PP, da Silva AJ. 2006. PCR as a confirmatory technique for laboratory diagnosis of malaria. *J Clin Microbiol* 44(3):1087-1089.
3. National Center for Biotechnology Information [NCBI]. 2013. PCR. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/genome/probe/doc/TechPCR.shtml> [terhubung berkala]. 12 Nov 2013.
4. Schuster FL. 2002. Cultivation of *Plasmodium spp.*. *Clin Microbiol Rev* 15(3):355-364.
5. Marfurt J, et al. 2008. Detection of the Human *Plasmodium* Species Protocol. Malaria Molecular Workshop.
6. Reni Herman, Endah Ariyanti, Ervi Salwati, Delima, Emiliana Tjitra. 2011. Deteksi dan spesiasi parasit malaria sampel monitoring pengobatan *dihydroartemisinin-piperaquin* di Kalimantan dan Sulawesi: mikroskopis vs *polymerase chain reaction*. *Media Litbang Kesehatan* 2(3):105-110.
7. Snounou G, Viriyakosol, Zhu XP, Jarra W, Pinheiro L, do Rosario VE, Thaitong S, Brown KN. 1993. High sensitivity of detection of human malaria parasite by the use of nested polymerase chain reaction. *Molec Biochem Parasitol* 61:315-320.
8. Singh B, Bobogare A, Cox-Singh J, Snounou G, Abdullah MS, Rahman HA. 1999. A genus- and species-specific nested polymerase chain reaction malaria detection assay for epidemiologic studies. *Am J Trop Med Hyg* 60:687-92.
9. Purelink™: quick gel extraction kit (Cat number: K210010- Invitrogen-California, USA).
10. Purelink™: quick Plasmid Miniprep Kit (Cat number: K210010, K2100-11- Invitrogen-California, USA).
11. Green MR, Sambrook J. 2012. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. USA: CSHL Press.
12. Ulmann A, Jacob FM. 1967. Characterization by *in vitro* complementation of a peptide corresponding to an operator-proximal segment of a β -galactosidase structural gene of *Escherichia coli*. *J Mol Biol* 24:339-343.
13. Davies J, Jacob F. 1968. Genetic mapping of the regulator and operator genes of the lac operon. *J Mol Biol* 36c:413-417.
14. Rooney AP. 2004. Mechanism underlying the evolution and maintenance of functionally heterogenous 18S rRNA genes in apicomplexans. *Mol Biol Evol* 21(9):1704-1711.
15. Arnot DE, Barnwell JW, Tam JP, Nussenzweig V, Nussenzweig RS, Enea V. 1985. Circumsporozoite protein of *Plasmodium vivax*: gene cloning and characterization of the immunodominant epitope. *Science* 230(4742):815-818.
16. Enea V, Ellis J, Zavala F, Arnot DE, Asavanich A, Masuda A, Quakyi I, Nussenzweig RS. 1984. DNA cloning of *Plasmodium falciparum* circumsporozoite gene: amino acid sequence to repetitive epitope. *Science* 225(4662):628-630.