

KLONING GEN FIM-C SALMONELLA TYPHIMURIUM DENGAN VEKTOR pGEM-T easy UNTUK PENGEMBANGAN VAKSIN REKOMBINAN PENYAKIT TYPHUS PADA MANUSIA

Muktiningsih Nurjayadi^{1,3}, Giri Alviyanto^{1,3}, Fera Kurnia Dewi^{1,3}, Irma Ratna Kartika^{1,3}, Fernita Puspasari², dan Dessy Natalia²

¹ Jurusan Kimia UNJ, Fakultas Matematika Ilmu Pengetahuan Alam. Universitas Negeri Jakarta Jl. Pemuda No. 10 Rawamangun Jakarta Indonesia

² Program Studi Kimia ITB, Bandung, Indonesia

³ Laboratorium Bioteknologi Fakultas Matematika Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Negeri Jakarta. Jl. Pemuda No. 10 Rawamangun Jakarta Indonesia

Corresponding Author: mutinurjayadi@yahoo.com

Abstrak

Bakteri *Salmonella typhimurium* merupakan penyebab penyakit typhus pada hewan mencit. Bakteri ini sering digunakan sebagai model untuk mempelajari penyakit typhus pada manusia. Penelitian ini bertujuan mendapatkan klon rekombinan gen fim-C *Salmonella typhimurium* dengan ukuran 0,7 kilobasa (pGEM-T-Stpm-fim-C) dan mengetahui karakteristik gen fim-C *Salmonella typhimurium* hasil kloning tersebut. Metode yang digunakan pada penelitian ini adalah metode eksploratif. Tahap yang dilakukan meliputi isolasi DNA genom *S. typhimurium*, amplifikasi gen fim-C *S. typhimurium* dengan metode PCR, karakterisasi gen fim-C *S. typhimurium* hasil amplifikasi, purifikasi gen fim-C *S. typhimurium*, kloning gen fim-C *S. typhimurium* dengan vektor pGEM-T easy, dan karakterisasi hasil kloning. Amplifikasi gen fim-C dengan metode PCR menggunakan primer FimC-Stpm-F dan FimC-Stpm-R menghasilkan pita DNA berukuran 0,7 kilobasa sesuai ukuran gen fim-C *S. typhimurium*. Kesesuaian tersebut menunjukkan bahwa desain dan sintesis primer serta amplifikasi berhasil dilakukan. Hasil kloning gen fim-C *S. typhimurium* 0,7 kb dengan vektor kloning pGEM-T easy memberikan koloni putih dan biru dengan ukuran yang sesuai standar. Analisis restriksi plasmid rekombinan pGEM-T-Stpm-fim-C dengan enzim BamHI dan HindIII menghasilkan dua pita berukuran 3 kb dan 0,7 kb sesuai ukuran DNA vektor pGEM-T easy dan gen fim-C *S. typhimurium* sebagai insert. Sekuensing klon rekombinan yang dihasilkan membuktikan bahwa urutan DNA *S. typhimurium* yang diperoleh memiliki homologi sebesar 99% dengan *S. typhimurium* LT2 pada GeneBank. Berdasarkan data-data tersebut disimpulkan bahwa pada penelitian ini telah berhasil dilakukan kloning gen fim-C *S. typhimurium* berukuran 0,7 kb pada vektor pGEM-T easy.

Kata kunci : *Salmonella typhimurium*, kloning gen fim-C *S. typhimurium*, vaksin rekombinan, penyakit typhus.

Abstract

Salmonella typhimurium is bacteria that causes typhus disease in mouse. Usually, *Salmonella typhimurium* is used as a model for typhus disease study in human. The research is aimed to obtain recombinant clone of *Salmonella typhimurium* fim-C gene 0.7kilobase(kb) and knowing characteristics of *Salmonella typhimurium* gene the cloning result. Method of this research is exploration. Step of this research are isolate DNA genome of *S. typhimurium* bacteria, amplify fim-C gene by PCR, characterize *S. typhimurium* fim-C the amplification product, purification of *S. typhimurium* fim-C gene, cloning of *S. typhimurium* fim-C gene with pGEM-T easy vector, characterize the cloning product. Amplification of fim-C gen by PCR used FimC-Stpm-F primer and FimC-Stpm-R primer produce DNA band 0.7kilbase appropriate with size of *S. typhimurium* fim-C gene. This result showing design, primer synthesis, and amplification has been successfully. The cloning result from *S. typhimurium* fim-C gene 0.7kb with cloning vector pGEM-T easy give white colony and blue colony. The restriction analysis of recombinant plasmid pGEM-T-Stpm-fim-C with BamHI and HindIII enzyme produces two band 3 kb and 0.7 kb which appropriate size of DNA pGEM-T-easy vector and *S. typhimurium* fim-C gene as insert. Sequencing of recombinant clone proving DNA *S. typhimurium* have 99% homolog with *S. typhimurium* LT2 in GeneBank. Conclusion this research is cloning of *S. typhimurium* fim-C gene 0.7kb with pGEM-T easy has been successfully.

Keywords: *Salmonella typhimurium*, cloning of *Salmonella typhimurium* fim-C gene, recombinant vaccine, typhus disease.

PENDAHULUAN

Penyebab penyakit typhus adalah *Salmonella typhi* yang habitatnya pada

manusia. Sehingga diperlukan model binatang untuk mempelajari patogenesis bakteri tersebut. Kurangnya atau tidak adanya model

binatang yang cocok (yang lebih tinggi dari primata) untuk *S. typhi* dengan habitat yang memiliki spesifisitas seperti manusia merupakan hambatan yang signifikan untuk mempelajari patogenesis *S. typhi* dan untuk menguji vaksin yang aman dan efektif melawan demam typhus. Oleh karena itu, untuk mempelajari patogenesis demam typhus digunakan *Salmonella typhimurium* dengan menggunakan model binatang mencit [6].

Fimbriae adalah protein permukaan yang terdapat pada bakteri gram positif dan gram negatif termasuk *S. typhimurium*. *Fimbriae* ini digunakan untuk menempelkan dirinya pada sel inangnya dan beberapa objek lainnya. Beberapa ciri-ciri telah dapat dikaji dan disimpulkan bahwa *fimbriae* pada *S. typhi* dan *S. typhimurium* memiliki peranan pada pertahanan bakteri dalam sel inangnya atau pada lingkungan eksternal [7]. Kemampuan menempel tersebut didukung oleh dimilikinya berbagai komponen pendukung seperti flagella dan *filli/fimbriae* yang berfungsi menembus *barrier* sel epitel dan menyerang sel inang.

Sebanyak 148-200 orang/100.000 penduduk Indonesia pada tahun 2002 [5] dan 358-810 orang/100.000 penduduk Indonesia pada tahun 2007 menderita demam typhus [4]. Melihat meningkatnya angka morbiditas tersebut maka diperlukan suatu alternatif untuk penanganan atau pencegahan penyakit typhus. Alternatif yang diperlukan untuk pencegahan penyakit typhus adalah dengan menggunakan vaksin. Saat ini vaksin yang digunakan untuk pencegahan typhus adalah vaksin Ty21a (oral) dan vaksin Vi CPS (suntik). Namun, vaksin ini memiliki kelemahan dimana akan mengalami penurunan efektivitas perlindungannya pada penyakit typhus jika daerah tersebut merupakan daerah hiper-endemik seperti Indonesia. Kelemahan lainnya adalah hanya dapat digunakan pada orang dewasa dan anak-anak usia 6 tahun atau lebih,

serta harus dilakukan pengulangan setiap 5 tahun. Vaksin-vaksin tersebut ternyata juga memiliki efek samping pada penggunaannya dan tidak efisien, karena dibutuhkan pengulangan vaksinasi. Efek samping yang dialami oleh orang yang mendapatkan vaksin adalah mual, muntah, rasa tidak nyaman di perut, demam, dan sakit kepala. Oleh karena itu, dibutuhkan vaksin yang lebih aman dan efisien [2].

Melihat luasnya penyebaran dan banyaknya pasien typhus, maka vaksin rekombinan ini akan sangat membantu dalam mengatasi permasalahan yang ada. Berdasarkan hal tersebut maka penelitian ini penting untuk dilaksanakan. Penelitian yang dilaporkan ini merupakan tahap awal dalam pembuatan vaksin rekombinan yang aman dan efisien, dengan tujuan mendapatkan klon rekombinan dengan cara kloning gen *fim-C Salmonella typhimurium* dan karakterisasi hasil kloningnya.

METODOLOGI PENELITIAN

Perancangan dan Sintesis Primer Fimbrial-C dengan Penambahan Urutan Nukleotida Pengode Histidin

Primer spesifik yang digunakan pada penelitian ini didesain langsung dari urutan gen *fim-C S.typhimurium* penelitian sebelumnya. Primer yang digunakan merupakan satu buah rancangan primer forward (*FimC-Stpm-F*) dan satu buah rancangan primer reverse (*FimC-Stpm-R*). Primer tersebut sebelumnya ditambahkan sepuluh asam amino pengode histidin dan urutan nukleotida pengenalan enzim restriksi *Hind III* pada ujung 3' sedangkan pada ujung 5' ditambahkan urutan nukleotida pengenalan enzim restriksi *BamH I*. Untuk sintesis primer dilakukan oleh *First-Base Laboratory* Korea.

Penumbuhan Biakan Bakteri *S. typhimurium* di Laboratorium Biokimia FMIPA UNJ

Bakteri yang digunakan pada penelitian ini adalah bakteri *S. typhimurium* galur lokal yang

Tabel 1. Primer Gen fim-C *S. typhimurium* Berukuran 0,7 Kilobasa

No.	Primer	Sekuens	Skala	%G C	TM °C	MW
1.	FimC- Stpm-F	5'- GGA TCC AAA AAA AAC GTA CCG ATT TTC CTT CG -3'	0,05 µmol	40,6	70,0	9.786,1
2.	FimC- Stpm-R	5'- AAG CTT TCA TGA AGC TGG ACA AAC GCG TG -3'	0,05 µmol	48,3	70,4	8.968,0

diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi FK-UI selanjutnya bakteri tersebut dibiakkan dan diremajakan di Laboratorium Biokimia-Bioteknologi FMIPA UNJ sebagai bakteri uji.

Pembiakan Bakteri *S. typhimurium* pada Media Nutrient Broth Cair

Pelaksanaan peremajaan bakteri-bakteri pada penelitian ini ditempuh cara sebagai berikut: biakan bakteri pada agar miring diambil dengan kawat ose steril (satu koloni atau gores ose). Kemudian kawat ose steril yang telah ditempelkan pada bakteri dicelupkan pada 5 mL media *Nutrient broth* cair steril yang telah ditempatkan pada tabung reaksi. Selanjutnya diinkubasi pada suhu 37°C selama 16-18 jam dengan *aerasi shaker* sebesar 150 rpm. Hasil penumbuhan bakteri dicek dengan melihat kekeruhan yang timbul.

Pembiakan Bakteri *S. typhimurium* pada Nutrient Agar

Kawat ose steril dicelupkan pada biakan bakteri cair hasil penumbuhan pada tahap sebelumnya. Selanjutnya kawat ose tersebut digoreskan dengan cara zig-zag pada media *nutrient agar* steril yang telah disiapkan. Media *nutrient agar* yang telah mengandung bakteri diinkubasi 16-18 jam pada inkubator pada suhu 37 °C. Hasil penumbuhan bakteri di cek setelah proses inkubasi selama 16-18 jam.

Isolasi Genom *S. typhimurium* dan Karakterisasinya

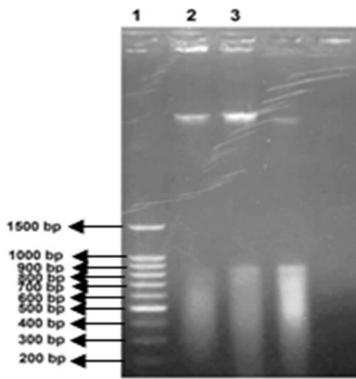
Tahapan yang ditempuh untuk proses isolasi DNA genom bakteri mengikuti kit isolasi *wizard* dari promega. Volume kultur bakteri yang diisolasi adalah 3mL. Hasil isolasi kemudian disimpan pada suhu 2-8°C. Hasil i

solasi dikarakterisasi dengan elektroforesis gel agarosa 1% dengan pewarna (pemendar warna saat terkena sinar UV) etidium bromida. Masing-masing 5µL DNA genom dicampurkan dengan 1µL *loading dye buffer* (buffer pewarna). Proses elektroforesis dilakukan pada kondisi 80 volt selama 1 jam. Visualisasi hasil elektroforesis dilakukan di bawah lampu UV dengan panjang gelombang 260 nm.

Amplifikasi Genom *S. typhimurium* dengan PCR dan Karakterisasinya

Pada penelitian ini amplifikasi DNA genom dilakukan dengan mesin *thermal cycle*, pasangan primer fimC-Stpm-F (5'-GGA TCC AAA AAA AAC GTA CCG ATT TTC CTT CG-3') dan primer fimC-Stpm-R (5'-AAG CTT TCA TGA AGC TGG ACA AAC GCG TG-3'), *nuclease free water*, serta *Master Mix* PCR. Total reaksi sebanyak 25µL. Komposisinya adalah sebagai berikut: *Master Mix* PCR 12,5µL, 2,5µL pasangan primer fim-C, *nuclease free water* 9µL, dan sampel DNA genom bakteri 1µL dimasukkan ke dalam tabung PCR dan dihomogenisasi. Selanjutnya tabung berisi campuran dimasukkan ke dalam mesin *thermal cycle* dengan kondisi pemanasan awal pada suhu 95°C selama 5 menit, denaturasi pada suhu 95°C selama 1 menit, *annealing* pada suhu 55,8°C selama 1 menit, tahap pemanjangan rantai pada suhu 72°C selama 1 menit, dan tahap pemantapan produk pada suhu 72°C selama 7 menit, dengan jumlah siklus sebanyak 35 siklus dan dilakukan pada suhu ruang (25 °C).

Hasil amplifikasi kemudian dikarakterisasi dengan elektroforesis gel agarosa 2% dengan pewarna etidium bromida 0,1%. Proses



Gambar 1. Karakterisasi Hasil Isolasi DNA Genom Bakteri *S. typhimurium*. Elektroforesis dilakukan dengan gel agarosa 1% dan well berisi 1. Marker (5 µL Ladder), 2. *S. typhi* (5 µL), 3. *S. typhimurium* (5 µL).

elektroforesis dilakukan pada kondisi 80 volt selama 1 jam. Visualisasi hasil elektroforesis dilakukan di bawah lampu UV dengan panjang gelombang 260 nm. Setelah itu, gen *fim-C* hasil amplifikasi dengan PCR dipurifikasi mengikuti kit PCR *purification* dari promega. Hasil purifikasi kemudian disimpan pada suhu 4°C sampai -20°C dan diarakterisasi dengan elektroforesis gel agarosa 2% dengan pewarna etidium bromida 0,1%. Proses elektroforesis dilakukan pada kondisi 80 volt selama 1 jam. Visualisasi hasil elektroforesis dilakukan di bawah lampu UV dengan panjang gelombang 260 nm.

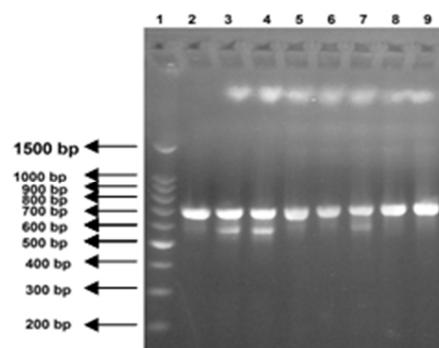
Kloning Gen *fim-C* dengan Ukuran 0,7 Kilobasa Ligasi Produk PCR Gen *fim-C* dengan Vektor pGEM-T easy

Reaksi ligasi dilakukan sesuai prosedur kit vektor pGEM-T *easy*. Jumlah vektor dan DNA hasil PCR yang digunakan dalam reaksi ligasi diambil sesuai dengan rasio perbandingan molar yang dianjurkan pada kit. Rasio perbandingan molar sisipan : vektor adalah 3 : 1. Ukuran vektor pGEM-T *easy* 3kb dan ukuran sisipan gen *fim-c* *S. typhimurium* 0,7kb. Berdasarkan perbandingan molar dengan rumus dari kit pGEM-T *easy* untuk reaksi ligasi menggunakan 50 ng vektor, jumlah sisipan yang harus ditambahkan adalah 35ng. Reaksi

dilakukan dalam tabung *ependorf* 1,5 mL dengan mencampurkan 5µL bufer ligasi 2x T4 DNA ligase; 1µL (50 ng) vektor pGEM-T *easy*; 1µL enzim T4 DNA ligase 3 u/µL; 3 µL (35ng) hasil PCR yang telah dimurnikan dengan presipitasi etanol. Volume akhir campuran dibuat menjadi 10µL. Campuran dihomogenkan dengan pipet, dilanjutkan dengan inkubasi pada 4°C selama semalam. Hasil reaksi ligasi dapat disimpan pada suhu 2-8°C sampai akan digunakan.

Transformasi *E.coli* TOP10 dengan Hasil Ligasi

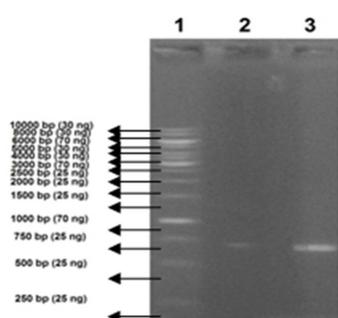
E.coli TOP10 selanjutnya ditransformasi dengan hasil ligasi. Sebelum dilakukan transformasi, *E.coli* TOP10 harus dipersiapkan menjadi kompeten sel agar mempunyai efisiensi yang tinggi dalam menerima DNA dari luar pada proses transformasi. Transformasi *E.coli* TOP10 dengan hasil ligasi dilakukan dengan metode kejutan panas. Setelah itu dilakukan skrining koloni putih-biru. Koloni yang diduga positif (koloni putih) lalu di ambil dan dikultur dalam media LB-ampisilin cair untuk selanjutnya diekstrak plasmidnya.



Gambar 2 Hasil Amplifikasi *S.typhimurium* dengan Variasi Suhu Annealing. Hasil amplifikasi diarakterisasi dengan elektroforesis gel agarosa 2% dan variasi suhu annealing yang digunakan 1. Marker; 2. Suhu 680C; 3. Suhu 66,80C; 4. Suhu 64,60C; 5. Suhu 60,60C; 6. Suhu 55,80C; 7. Suhu 51,90C; 8. Suhu 49,30C; 9.Suhu 48,00C.

Karakterisasi Hasil Transformasi dengan Size Screening

Koloni putih dan biru yang dihasilkan dari hasil transformasi dipindahkan ke dalam media agar LB dan diinkubasi 37°C selama 16-18 jam. Beberapa koloni putih dan biru diambil dengan tusuk gigi steril dan dimasukkan ke dalam 25µL rapid disruption solution. Setelah itu, dipanaskan dalam air mendidih selama 5 menit lalu disentrifugasi 12000rpm selama 5 menit. Kemudian dirunning dalam gel agarosa 1%, 80 volt, 30 menit.



Gambar 3 Hasil Purifikasi Gen fim-C *S.typhimurium* dengan Ladder 1 kb. Hasil purifikasi dikarakterisasi dengan elektroforesis gel agarosa 1% dan well berisi 1.Marker; 2. Hasil purifikasi gen fim-C *S.typhi*; 3.Hasil purifikasi *S.typhimurium*.

Isolasi Plasmid Rekombinan

Isolasi DNA plasmid sel transforman dilakukan dengan menggunakan *High-Speed Plasmid Kit*. Karakterisasi hasil isolasi dilakukan dengan elektroforesis gel agarosa 1% dengan pewarna etidium bromida 0,1%. Proses elektroforesis dilakukan pada kondisi 80 volt selama 30 menit. Visualisasi hasil elektroforesis dilakukan di bawah lampu UV.

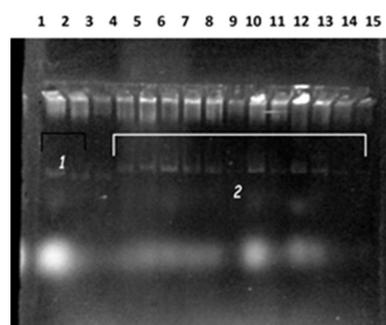
Karakterisasi Hasil Isolasi Plasmid dengan Analisis Restriksi

Karakterisasi hasil kloning dilakukan dengan enzim restriksi Enzim restriksi yang digunakan adalah *BamH I* dan *Hind III*. Analisis dilakukan dalam 10µL campuran reaksi yang berisi 5µL fragmen DNA gen fim-C *S. typhimurium* hasil kloning, 0,1 µL *BamH I*, 0,1 µL *Hind III*, 1µL stok buffer enzim (sesuai

dengan enzim yang digunakan dan berasal dari produsen enzim yang bersangkutan), dan *nuclease free water* sebanyak 3,8µL. Inkubasi untuk pemotongan sempurna DNA dengan enzim dilakukan pada temperatur 37°C selama semalam. Hasil pemotongan DNA dengan enzim restriksi tersebut selanjutnya dianalisis dengan metode elektroforesis gel agarosa 1%. Proses elektroforesis dan visualisasi hasil dilakukan sama dengan tahap sebelumnya.

Analisis Sekuen DNA Gen fim-C

Analisis sekuen DNA gen fim-C dilakukan untuk mengetahui sekuen gen target telah terfusi his-tag. DNA target disekuensing dengan menggunakan sekuenser (*Applied Biosystem Instrument*).



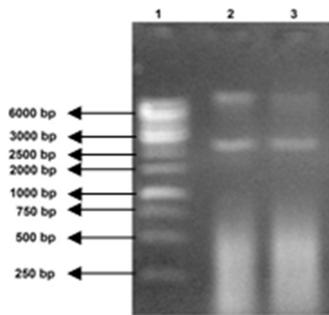
Gambar 4 Hasil size screening. Karakterisasi size screening dilakukan dengan elektroforesis gel agarosa 1% dan well berisi 1) Koloni biru; 4-15) Koloni putih. Dari hasil elektroforesis dapat diketahui ada perbedaan ukuran antara pita koloni biru (1) dengan pita koloni putih (2).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Perancangan Primer Spesifik Gen fim-C *Salmonella typhi*

Perancangan primer spesifik gen fim-C *S.typhimurium* digunakan program DNASTar. Pada perancangan primer disisipkan urutan enzim *BamHI* pada ujung 5' dan enzim *HindIII* pada ujung 3'. Hal ini untuk memudahkan pemotongan hasil subkloning dengan vektor ekspresi pada penelitian selanjutnya. Hasil dari perancangan primer didapatkan sepasang primer *forward* dan primer *reverse* disajikan

pada tabel 1. Primer yang telah didapatkan kemudian digunakan dalam proses amplifikasi gen fim-C bakteri *S. typhimurium*.



Gambar 5 Hasil Isolasi Plasmid Rekombinan. Hasil isolasi plasmid rekombinan dikarakterisasi gel agarosa 1% dengan well berisi 1. Marker; 2. Hasil isolasi plasmid koloni 12; 3. Hasil isolasi plasmid koloni 16.

Penumbuhan Biakan Bakteri *S. typhimurium*

Penumbuhan biakan bakteri *Salmonella typhimurium* pada media cair (*Nutrient Broth*) telah berhasil dilakukan. Tumbuhnya bakteri ditandai dengan keruhnya media pertumbuhan dibandingkan dengan media *Nutrient Broth* steril. Makin keruh media menunjukkan bakteri dapat tumbuh dengan baik pada media. Kultur bakteri hasil penumbuhan pada media NB, kemudian dibiakkan pada media *Nutrient Agar* (NA) selama 24 jam pada suhu 37°C dan didapatkan hasil yang menunjukkan terbentuknya koloni-koloni tunggal dari *S. typhimurium*.

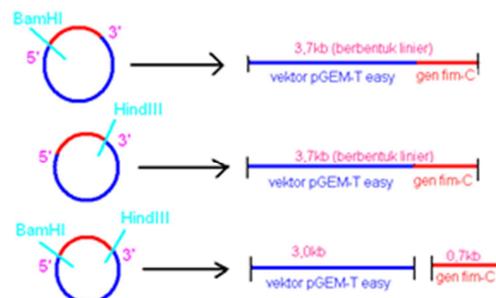
Isolasi Genom Bakteri *S. typhimurium* dan Karakterisasinya dengan Elektroforesis

Isolasi DNA genom bakteri *Salmonella typhimurium* dilakukan dengan kit isolasi *Wizard*. DNA genom bakteri hasil isolasi selanjutnya dikarakterisasi dengan elektroforesis gel agarosa 1%. Hasil elektroforesis disajikan pada gambar 1. Berdasarkan hasil elektroforesis diketahui bahwa DNA genom bakteri *S. typhimurium* telah berhasil diisolasi. Hal ini ditandai dengan munculnya pita-pita DNA pada gel. Adanya 2 pita dengan ukuran lebih dari 2 kb

menunjukkan bahwa *S. typhimurium* berbentuk sirkular. Hasil ini sesuai dengan literatur yang menunjukkan bahwa ukuran DNA genom *S. typhimurium* sebesar 4,81 mega base pairs (mb) [3].

Amplifikasi Genom Bakteri *S. typhimurium* dengan Primer yang Spesifik dan Karakterisasinya dengan Elektroforesis

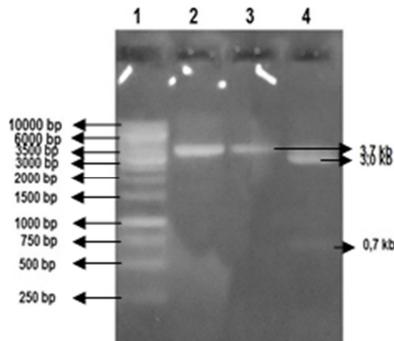
Proses amplifikasi PCR dengan pasangan primer fimC-Stpm-F dan fimC-Stpm-R yang menggunakan templat DNA genom bakteri *S. typhimurium* telah berhasil memperoleh amplicon berukuran 0,7 kb. Proses amplifikasi *S. typhimurium* dilakukan dengan variasi suhu *annealing* mulai dari 48°C-68°C. Hal ini bertujuan untuk mengetahui suhu *annealing* (penempelan) primer secara optimum. Hasil amplifikasi gen *fim-C S. typhimurium* dapat dilihat dari hasil elektroforesis dengan agarosa 2% pada gambar 2.



Gambar 6 Gambaran hasil analisis restriksi plasmid rekombinan pGEM-fimC *S. typhimurium*. Analisis teoritis menunjukkan plasmid rekombinan pGEM-fimC *S. typhimurium* dapat dipotong dengan enzim restriksi BamHI dan Hind III.

Dari hasil elektroforesis diketahui bahwa suhu optimum *annealing* (penempelan) primer terhadap templat DNA *S. typhimurium* adalah 60,6°C dan didapatkan hasil ampifikasi *S. typhimurium* dengan panjang fragmen 0,7 kb. Gel agarosa hasil elektroforesis yang berisi templat hasil PCR berukuran 0,7 kb, kemudian dimurnikan dengan menggunakan kit purifikasi. Hasil pemurnian dari bakteri tersebut kemudian ditentukan konsentrasinya

dengan elektroforesis menggunakan *ladder* 1kb. Purifikasi dilakukan untuk memurnikan DNA bakteri dari gel agarosa. Karakterisasi hasil purifikasi dilakukan dengan elektroforesis gel agarosa 1%. Foto hasil amplifikasi *S.typhimurium* dan hasil purifikasi disajikan pada gambar 3.



Gambar 7 Hasil Analisis Restriksi Plasmid Rekombinan fim-C *S.typhimurium*. 1. Marker; Hasil pemotongan plasmid koloni 12 dengan enzim restriksi 2. BamHI; 3. HindIII; 4. BamHI dan HindIII.

Dari hasil elektroforesis dapat diketahui bahwa intensitas pita yang timbul (1) setara dengan pita 750bp yang mempunyai konsentrasi 70 ng. Namun, karena volume gen yang di running adalah 2 μ L sehingga konsentrasi dari gen fim-C *S.typhimurium* sebesar 35 ng/ μ L.

Kloning Gen Fim-C Salmonella

typhimurium dengan Ukuran 0,7 Kilobasa dan Karakterisasinya

Kloning gen fim-C *S.typhimurium* dilakukan melalui beberapa tahap, yaitu 1) ligasi gen fim-C dengan vektor pGEM-T *easy*; 2) Transformasi bakteri *E.coli* TOP10 dengan hasil ligasi ; 3) Karakterisasi hasil transformasi dengan *size screening*; 4) Isolasi plasmid rekombinan; 5) Karakterisasi hasil isolasi plasmid dengan elektroforesis gel dan analisis restriksi; 6) Sekuensing hasil kloning gen fim-C *S.typhimurium* dengan vektor kloning pGEM-T *easy*. Tahapan kloning dilakukan dengan tujuan memperbanyak gen fim-C *S.typhimurium* yang pada penelitian selanjutnya akan disubkloning ke vektor

ekspresi sehingga didapatkan protein dari gen fim-C *S.typhimurium*.

Ligasi Gen Fim-C *S.typhimurium* dengan vektor pGEM-T *easy*

Reaksi ligasi dilakukan sesuai prosedur kit vektor pGEM-T *easy*. Hasil purifikasi amplifikasi produk PCR fim-C yang telah didapat selanjutnya dijadikan sebagai *insert* dalam proses ligasi ke vektor kloning. Vektor kloning yang digunakan dalam penelitian ini adalah plasmid pGEM-T *easy*. Penggunaan vektor pGEM-T *easy* memiliki beberapa keuntungan, antara lain adalah plasmid ini merupakan plasmid linear yang mempunyai basa Timin (T) menggantung (*overhangs*) pada kedua ujungnya. Daerah T-*overhangs* pada situs pemasukan insert ini meningkatkan efisiensi ligasi untuk produk PCR karena mencegah terjadinya resirkularisasi (melingkar kembali) vektor sebelum penempelan insert. *Insert* yang merupakan produk PCR hanya perlu diberi perlakuan sederhana untuk menambahkan basa Adenin (A) pada ujungnya atau biasa disebut dengan *A-tailing* agar bisa menempel pada daerah T-*overhangs* vektor tanpa harus memotongnya terlebih dahulu dengan enzim restriksi.

```
AAGCTTTTCATGAAGCTGGACAAACCGCTGCTGGCGTCTTGCGCCAAAAT
CGTTTACCGTGCGCAAAGATACCTGGCCGGCGCTCGCCGGGAGAGTGATC
GCGCCTTTCGGCGGTACCATAGTATTCGGCAGTTTTTCCCCGCGTATACA
GTTCAACCATCGAAACGTAGTACGGCGAAGGGTTAGTAATCGTTAGCTGGC
CGCGCTCGTTACGGCAGCGAAGCGTCCGACGGGGCATGAGCTGGCGCCTCC
GCCAGATTTTTCGGGCGGATAAATAGCTTAATCACGCTTTGCGTCGCAATTT
GCAGGGAGTTGCCGGTCAATTTATTTTTATCGACAGAGGGTATCGTTTTACT
GTTTAAATAAAATACGCTTTTCGCGATCGGTGCGTAATGACGGCCGACATAC
ATAATACGTAATATATTTTCTTTTTAGGCTGGATCACAAGAGAGGGCGCGT
AATGATAAAATCCGTCGAGCGTGAACCATCGGCATTGGCGACCCATGACTG
AATTAATAAAACATTGCTGGCAGAAGAATTAATAATCGGCAAGGAGTTTGC
TTACTTCCCTGCGGATAAATCACCTGCTCGCGCCAGCGCAATGCCTCCC
GCCTGCGCGCAAACGACAGGCCGGCCGCCGACAGCAGTAGCAATAATCG
AAGGAAAATCGGTACGTTTTTTTTGGATCC
```

Gambar 8 Hasil Sekuensing Klone 12 dari Daerah Primer Reverse Hingga Daerah Primer Forward. Urutan nukleotida yang diberikan warna merah dan digaris bawah merupakan daerah primer yang sesuai setelah dicocokkan dengan urutan primer yang digunakan pada saat amplifikasi gen fim-C.

Transformasi Bakteri E.coli TOP10 dengan Hasil Ligasi

Pada tahap ini telah berhasil dikloning gen fimC *S.typhimurium* yang dikonstruksikan pada plasmid pGEM-T *easy*. Hal ini ditunjukkan dengan diperolehnya koloni putih pada media LB X-gal/IPTG. Koloni putih yang diperoleh menunjukkan bahwa vektor pGEM-T *easy* pada sel transforman *E. coli* TOP 10 mengandung sisipan berupa fragmen 0,7 kb.

Asumsi tentang keberhasilan proses kloning didasarkan pada: (1) Peta sirkular vektor pGEM-T *easy* telah diketahui memiliki dua marker yaitu gen LacZ dan gen resisten ampisilin. Masuknya sisipan DNA 0,7 kb akan memotong urutan gen LacZ, sehingga gen tersebut tidak menghasilkan enzim β -galaktosidase yang dapat menguraikan substrat mirip laktosa yaitu X-gal (5-bromo-4-kloro-3-indoil- β -D-galaktopiranosida) dengan bantuan *inducer* IPTG (isopropil- β -D-galaktopiranosida) menjadi galaktosa dan substansi berwarna biru (5-bromo-4-kloroindigo). Terpotongnya urutan gen LacZ menyebabkan sel inang tidak menghasilkan enzim β -galaktosidase dan akhirnya X-gal pada medium tidak dapat diubah menjadi senyawa biru, (2) *E. coli* TOP 10 yang digunakan sebagai sel inang pada proses kloning diketahui memiliki sifat sensitif terhadap ampisilin, berdasarkan hasil yang diperoleh ternyata sel inang yang ditransformasi dengan vektor pGEM-T rekombinan dapat hidup pada media yang mengandung ampisilin. Kontrol negatif terhadap sel inang yang tidak ditransformasi dengan plasmid rekombinan menunjukkan sel inang tersebut tidak dapat tumbuh pada media yang mengandung ampisilin. Berdasarkan fenomena tersebut disimpulkan telah berhasil dilakukan proses kloning gen fimC *S.typhimurium* yang dikonstruksikan pada vektor pGEM-T *easy* dalam sel inang *E.coli* TOP 10. Untuk memastikan bahwa koloni putih benar ada *insert* nya maka dilakukan *size*

screening. *Size screening* ini merupakan suatu cara untuk memastikan bahwa terdapat insert dalam plasmid dengan membandingkan ukuran plasmid koloni biru dan ukuran plasmid koloni putih. Pada *size screening* ini digunakan *rapid disruption solution* yang melisis sel sehingga didapatkan plasmid rekombinannya. Perbandingan ukuran plasmid diketahui dengan elektroforesis gel agarosa 1 %. Foto hasil *size screening* antara koloni putih dan biru disajikan dalam gambar 4.



Gambar 9 Hasil Sekuensing Klon 16 dari Daerah Primer Reverse Hingga Daerah Primer Forward. Urutan nukleotida yang diberikan warna merah dan digaris bawah merupakan daerah primer yang sesuai setelah dicocokkan dengan urutan primer yang digunakan pada saat amplifikasi gen fim-C.

Dari hasil elektroforesis terdapat perbedaan ukuran antara pita koloni biru (1) dengan pita koloni putih (2). Adanya perbedaan ukuran pita disebabkan karena pada koloni biru tidak terdapat *insert* sedangkan pada koloni putih terdapat *insert* sehingga ukuran fragmen semakin bertambah. Hal ini menandakan bahwa pada koloni putih benar terdapat *insert* gen fim-C pada vektor pGEM-T *easy*.

Isolasi Plasmid Rekombinan

Isolasi plasmid rekombinan dari dua koloni putih hasil transformasi yaitu koloni nomor 6 dan 7 yang dilakukan dengan kit *High Speed Plasmid* telah berhasil dilakukan. Hasil dari isolasi plasmid rekombinan ini divisualisasikan dengan elektroforesis dan disajikan pada gambar 5.

Berdasarkan data hasil elektroforesis yang disajikan pada gambar 5 diketahui bahwa plasmid rekombinan telah berhasil diisolasi. Hal ini ditandai dengan munculnya pita-pita DNA pada gel. Untuk memastikan terdapatnya *insert* pada plasmid pemotongan yaitu dengan *BamH* I saja, *Hind* III saja, dan dengan keduanya (*double digest*). Secara teoritis enzim restriksi *BamH* I akan memotong plasmid pGEM-rekombinan pada satu sisi dengan sisi pengenalan G↓GATCC pada bagian 5', enzim restriksi *Hind* III akan memotong pada satu sisi dengan sisi pengenalan A↓AGCTT pada bagian 3'. Sehingga masing-masing hasil pemotongan tersebut akan menghasilkan satu pita dengan ukuran 3700 pb. Pemotongan klon rekombinan dengan dua enzim restriksi (*dobel digest*) secara bersamaan akan menghasilkan 2 pita yang masing-masing berukuran 3000 pb (ukuran vektor pGEM-T *easy*) dan 700 pb (ukuran gen *fim-C* *S. typhimurium*). Gambaran hasil analisis restriksi secara teoritis dapat dilihat pada gambar 6.

Analisis Pemotongan enzim restriksi secara eksperimen dilakukan sesuai petunjuk dari promega. Hasil eksperimen menunjukkan pemotongan plasmid pGEM-rekombinan dengan Enzim *BamH* I dan enzim *Hind* III menghasilkan masing-masing satu pita berukuran 3,7 kb. Hasil pemotongan enzim *BamH* I dan *Hind* III secara *dobel digest* menghasilkan dua pita DNA dengan ukuran 3 kb vektor pGEM-T *easy* dan 0,7 kb gen *fimC*. Adanya 2 pita dengan ukuran 3,0 kb dan 0,7kb membuktikan bahwa terdapat *insert* yang pada vektor pGEM-T *easy* sesuai analisis restriksi secara teoritis. Foto visualisasi hasil pemotongan secara eksperimen dengan elektroforesis gel agarosa disajikan dalam gambar 7.

Sekuensing Urutan Nukleotida Gen *fim-C* Hasil Kloning Bakteri *Salmonella typhimurium*

Hasil isolasi plasmid dari isolat *E.coli* TOP10 rekombinan klon 12 dan klon 16 yang

berisi *insert* gen *fim-C* telah berhasil disekuensing di Macrogen, Korea. Sekuen gen *fim-C* klon 12 dalam bentuk FASTA disajikan pada gambar 8 sedangkan sekuen gen *fim-C* klon 16 disajikan pada gambar 9. Tanda yang digaris bawah dan diberi warna merah pada sekuen adalah daerah primer yang sesuai setelah dicocokkan dengan urutan primer yang digunakan pada saat amplifikasi gen *fim-C*. Hasil sekuensing menunjukkan bahwa telah berhasil didapatkan pGEM-*fimC* *S.typhimurium* yang ditandai dengan adanya daerah primer pada hasil sekuen. Untuk menganalisis homologi hasil sekuensing diambil dari daerah primer *forward* sampai daerah primer *reverse*. Hasil sekuen menunjukkan bahwa terdapat kesamaan 100% diantara dua urutan sekuen tersebut. Analisis homologi dilakukan dengan program BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov) pada 17 Juli 2012. Hasil BLAST menunjukkan gen *fim-C* hasil kloning memiliki homologi sebesar 100% dengan urutan nukleotida gen *fim-C* *S. typhimurium* Lt2 yaitu pada urutan nukleotida gen *fim-C* *S.typhimurium* Lt2. Hasil penelitian ini selanjutnya dijadikan sebagai acuan untuk penelitian berikutnya dalam rangka penemuan vaksin rekombinan untuk pencegahan penyakit typhus. Hasil kloning dari vektor pGEM-T selanjutnya disubkloning ke vektor pET untuk memperoleh protein yang nantinya akan dijadikan sebagai vaksin rekombinan.

KESIMPULAN

Hasil penelitian menunjukkan telah berhasil didapatkan klon rekombinan pGEM-*fimC* *S.typhimurium*. Klon rekombinan diperoleh dengan cara meligasi gen *fim-C* dengan vektor pGEM-T *easy*, mentransformasi bakteri *E.coli* TOP10 dengan hasil ligasi, mengkarakterisasi hasil transformasi dengan *size screening*, mengisolasi plasmid rekombinan, dan mengkarakterisasi hasil isolasi plasmid dengan analisis restriksi serta teknik sekuensing. Hasil analisis restriksi pada klon rekombinan menunjukkan telah terdapat

insert pada vektor pGEM-T easy. Hasil ini diperkuat dengan hasil sekuensing. Hasil sekuensing menunjukkan bahwa telah berhasil didapatkan pGEM-fimC *S.typhimurium* yang ditandai dengan adanya daerah primer pada hasil sekuen. dan diketahui bahwa gen fim-C ini mempunyai homolog sebesar 100% dengan *S.typhimurium* Lt2.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terimakasih kami haturkan kepada Direktorat P2M Ditjen Dikti yang telah memberikan Hibah Strategis Nasional sehingga Penelitian ini dapat berlangsung. Dessy Natalia, Ph.D, Ikhsanawati, Ph.D dan Dr. Fernita Puspasari dari Laboratorium Biokimia FMIPA ITB atas segala saran dan bantuannya sehingga penelitian dapat berjalan lancar.

DAFTAR PUSTAKA

- [1] Anonim, Promega. 2010. *DNA Purification*. <http://www.promega.com/resources/product-guides-and-selectors/protocols-and-applications-guide/dna-purification/#title7>, 3 Februari 2012, pk. 10.59 WIB.
- [2] Anonim, WHO. 2011. *Diarrhoeal Diseases*. http://www.who.int/vaccine_research/diseases/diarrhoeal/en/index7.html, 25 Februari 2011, pk. 11.01 WIB.
- [3] Bacmap. 2003. *Bacterial Map*. <http://wishart.biology.ualberta.ca/BacMap/index.html>. 10 Juli 2012, pk. 19. 30 WIB.
- [4] Hatta, M. dan Smits, H. L. 2007. Detection of *Salmonella typhi* by Nested Polymerase Chain Reaction in Blood, Urine, and Stool Samples. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 76 (1): 139-143.
- [5] Leon, R. O., Camilo, J. A., M. Carolina D., Dong, B., Sujit, K. B., Magdarina, D. A., Zulfiqar, A. B., Do, G. C., Mohammad, A., Seonghye, S., John, W., Anne-Laure, P., M. John, A., Jeremy, F., Remon, A., Tikki, P., Claudia, M. G., Lorenz, V. S., John, D. C. 2008. A Study of Typhoid Fever in Five Asian Countries: *Disease Burden and Implications for Controls*. *Bulletin of the World Health Organization*. 86 (4): 241-320, <http://www.who.int/bulletin/volumes/86/4/06-039818-table-T1.html>, 25 Januari 2012, pk. 10.55 WIB.
- [6] O'Brien, A. D., Rosenstreich, D. L., Taylor, B. A. 1980. Control of Natural Resistance to *Salmonella typhimurium* and *Leishmania donovani* in Mice by Closely Linked but Distinct Genetic Loci. *Nature*. 287: 440-442. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2972545>, 13 Januari 2012, pk. 22.56 WIB.
- [7] QIAPREP. 2000. *Instructional manual*, Promega.
- [8] Rachmayanti dan A. S. Noer. 1998. Modifikasi Metode Isolasi DNA Plasmid sehingga Lebih Sederhana dan Dapat Dilakukan pada Suhu Kamar. *Journal The Malaysian of Analytical Science*, 4, 277-281.
- [9] Thorns, C. J. 1995. *Salmonella Fimbriae*: Novel Antigens in the Detection and Control of *Salmonella* Infections. *British Veterinary Journal* 151: 643-658.
- [10] Zhang, S., Robert, A. K., Renato, L. S., Helene, A. P., Manuela, R., Josely, F., Jairo, N., Renee, M. T., Garry, A., dan Andreas, J. B. 2003. Patogenesis Molekuler *Salmonella enterica* serotipe Diare typhimurium-induced. *Infection and Immunity*. 71 (1): 1-12. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC143292/>, 3 Januari 2012, pk. 21.16 WIB.