

BUKU REFERENSI KLONING GEN

**Kontruksi Koleksi Parsial Genom dan urutan
Nukleotida Sebagian Gen *ruvB Salmonella
typhimurium***



**Disusun Oleh:
Drs. Made Sukaryawan, M.Si., Ph.D**

b **Bening**
media PUBLISHING

BUKU REFERENSI KLONING GEN

Konstruksi Koleksi Parsial Genom dan urutan Nukleotida Sebagian Gen *ruvB* *Salmonella typhimurium*

copyright © Agustus 2022

Penulis : Drs. Made Sukaryawan, M.Si., Ph.D
Setting Dan Layout : Ardatia Murty.
Desain Cover : Sri Antika

Hak Penerbitan ada pada © Bening media Publishing 2022
Anggota IKAPI No. 019/SMS/20

Hakcipta © 2022 pada penulis
Isi diluar tanggung jawab percetakan

Ukuran 14,8 cm x 21 cm
Halaman : v +109 hlm

Hak cipta dilindungi Undang-undang
Dilarang mengutip, memperbanyak dan menerjemahkan
sebagian atau seluruh isi buku ini tanpa izin tertulis dari Bening
media Publishing

Cetakan I, Agustus 2022



Jl. Padat Karya
Palembang – Indonesia
Telp. 0823 7200 8910
E-mail : bening.mediapublishing@gmail.com
Website: www.bening-mediapublishing.com

ISBN : 978-623-5854-94-6

KATA PENGANTAR

Assalamu'alaikumwarahmatullahi wabarakatuh

Puji syukur kehadiran Allah Subhanahu Wata'ala, atas rahmat dan karunia-Nya yang berupa iman dan kesehatan akhirnya penulis dapat menyelesaikan buku referensi cloning gen. Buku referensi ini bersumber terutama dari tesis penulis yang berjudul "Kontruksi Koleksi Parsial Genom dan urutan Nukleotida Sebagian Gen *ruvB Salmonella typhimurium*.

Buku referensi ini dapat membantu mahasiswa dalam proses pembelajaran Biokimia 1 dan Biokimia 2 terutama pada pokok bahasan asam nukleat. Pada Biokimia 1 ada satu kali pertemuan tentang pengenalan asam nukleat. Sedangkan pada Biokimia 2 ada tujuh kali pertemuan membahas materi asam nukleat hingga DNA rekombinan dan kloning gen.

Mahasiswa saat ini merupakan era *digital natives* yaitu generasi yang lahir pada era digital, lebih banyak di dalam kehidupannya mengisi dengan menggunakan komputer, dan berbagai macam perangkat yang diproduksi di abad digital. Generasi *digital natives* menganggap perangkat komunikasi sebagai bagian integral dari kehidupan yang tidak dapat dipisahkan dengan teknologi. Pengembangan inovasi pembelajaran yang berbasis digital sudah menjadi kebutuhan untuk berlangsungnya proses pembelajaran, oleh karena itu penulis membuat buku dalam bentuk buka referensi dan ebook referensi cloning gen.

Akhirnya penulis mengucapkan terima kasih kepada semua pihak yang telah mendukung serta membantu dalam kegiatan dari persiapan sampai selesainya penyusunan buku ini.

Palembang, 5 Agustus 2022,

Penulis,

Drs. Made Sukaryawan, M.Si., Ph.D

DAFTAR ISI

KATA PENGANTAR	iii
DAFTAR ISI	v
BAB I PENDAHULUAN	1
BAB II KLONING GEN	5
1. <i>Salmonella typhimurium</i> dan <i>Salmonella Typhi</i>	5
2. Patogenesis Demam Tifoid	9
3. Gen <i>ruv</i>	12
4. Koleksi Genom	14
a. DNA Sisipan	15
b. Vektor	17
c. Kloning	19
5. Seleksi Koleksi Genom	22
6. <i>Polymerase Chain Reaction</i>	24
7. Sekuensing	25
BAB III TEKNIK DAN METODE KLONING GEN	27
1. <i>Polymerase Chain Reaction</i>	27
a. Persiapan DNA Templat	28
b. Amplifikasi DNA Templat	29
c. Elektroforesis Gel Agarosa	30
2. Isolasi DNA Kromosom	32
3. DNA Sisipan	35
4. Pemurnian Fragmen DNA	37
5. DNA Vektor	39
a. Defosforilasi Vektor	39
b. Ligasi	41
c. Transformasi	42

6. Isolasi DNA Plasmid Rekombinan	44
7. Karakterisasi DNA rekombinan	46
8. Sekuensing	48
9. Analisis homologi	49
1) Analisis Homologi DNA	49
2) Analisis Homologi Protein	50
BAB IV KARAKTERISASI TRANSFORMAN	51
1. <i>Polymerase Chain Reaction</i>	51
2. Koleksi Parsial Genom <i>S. typhimurium</i>	53
a. Hasil isolasi DNA Kromosom <i>S. typhimurium</i>	53
b. DNA Sisipan	55
c. DNA Vektor	59
d. Transformasi	61
3. Seleksi Koleksi Genom	61
4. Isolasi DNA Plasmid Rekombinan	62
a. Analisis Restriksi	64
b. Sekuensing	69
c. Analisis Homologi	70
1) Analisis Homologi DNA	71
2) Analisis Homologi Asam Amino	77
BAB V PENUTUP	82
DAFTAR PUSTAKA	85
LAMPIRAN	92

BAB I PENDAHULUAN

Demam tifoid (*typhoid fever*) merupakan penyakit endemik di negara-negara yang sedang berkembang termasuk di Indonesia dengan morbiditas dan mortalitas tinggi (Ball, 1982). Penyakit tersebut hanya terjadi pada manusia dengan gejala demam, sakit perut, lemah jantung dan nyeri otot (Jawetz *et al.*, 1984). Demam tifoid disebabkan oleh bakteri *Salmonella typhi* (*S. typhi*), yang termasuk bakteri gram negatif, genus *Salmonella* dan famili *Enterobacteriaceae* (Dorman *et al.*, 1980).

Bakteri *S. typhi* masuk ke dalam tubuh manusia melalui mulut, bersama-sama dengan makanan dan minuman yang terkontaminasi oleh bakteri tersebut (Maegraith *et al.*, 1977). Mekanisme patogenesis *S. typhi* pada tingkat molekul belum banyak diketahui, karena gen yang bertanggung jawab terhadap sifat patogenesis *S. typhi* belum

seluruhnya diketahui. Untuk menemukan gen-gen yang bertanggungjawab terhadap patogenesis *S. typhi* sulit dilakukan, karena sel inangnya adalah manusia. Oleh karena itu digunakan *Salmonella typhimurium* (*S. typhimurium*) sebagai model karena bakteri ini menyebabkan penyakit mirip tifoid pada mencit (Bhriain *et al.*, 1980).

Gen yang mempunyai sifat patogenesis diduga ada kaitannya dengan gen yang terekspresi secara *in vivo*. Salah satu metode yang dapat digunakan untuk menemukan gen-gen yang terekspresi secara *in vivo* adalah metode *In Vivo Expression Technology* (IVET) (Mahan *et al.*, 1993). Melalui metode IVET telah ditemukan lima gen *S. typhimurium* yang terekspresi *in vivo*. Kelima gen tersebut adalah gen *ivi* (*in vivo induced*) I, *ivi*II, *ivi*III, *ivi*IV, dan *ivi*V. Gen-gen tersebut hanya terekspresi secara *in vivo* dan diduga bertanggung jawab terhadap patogenesis *S. typhimurium* pada mencit.

Pada penelitian ini digunakan pendekatan koleksi parsial genom *S. typhimurium* untuk memperoleh informasi gen-gen yang bertanggung jawab terhadap sifat patogenesis *S. typhimurium*. Koleksi genom dibuat dengan pemotongan parsial DNA kromosom *S. typhimurium*. Koleksi genom yang diperoleh akan diseleksi secara fenotipik, yaitu adanya koloni yang berwarna biru dan koloni yang tidak berwarna.

Tujuan penelitian ini adalah untuk memperoleh sebagian informasi genetik dari koleksi parsial genom *S. typhimurium*. Pendekatan yang dilakukan untuk mencapai tujuan tersebut adalah menentukan urutan nukleotida beberapa klon koleksi parsial genom *S. typhimurium*. Kemudian dilakukan analisis homologi urutan nukleotida tersebut, dengan bantuan Internet menggunakan program *Blast* dengan data yang ada pada *GenBank*. Proses ini dilakukan dengan memasukkan urutan fragmen DNA dari koleksi parsial genom *S. typhimurium* ke

program *Genmon*, melalui program ini urutan nukleotida dipindahkan ke program word, selanjutnya di submit ke *Blastn Sequence Similarity* pada *GenBank*. Dengan bantuan program *Genmon* ini dapat juga dilakukan analisis homologi tingkat protein, yaitu urutan fragmen DNA dari koleksi parsial genom diterjemahkan ke dalam urutan asam amino, dengan cara yang sama seperti yang dilakukan pada analisis homologi DNA urutan asam amino yang di submit ke *Blastp Sequence Similarity* pada *GenBank*. Hasil penelitian ini diharapkan dapat melengkapi data urutan nukleotida maupun urutan asam amino di masa yang akan datang sehingga mekanisme patogenesis *S. typhi* dapat difahami.

BAB II KLONING GEN

Seperti yang telah dikemukakan pada BAB pendahuluan, tujuan penelitian ini adalah untuk memperoleh sebagian informasi genetik dari koleksi parsial genom *S. typhimurium*. Untuk mencapai tujuan tersebut, pada BAB ini akan dibahas: *S. typhimurium* dan *S. typhi*, patogenesis demam tifoid, gen *ruv*, koleksi genom, seleksi koleksi genom, *Polymerase Chain Reaction* dan sekuensing.

1. *S. typhimurium* dan *S. typhi*

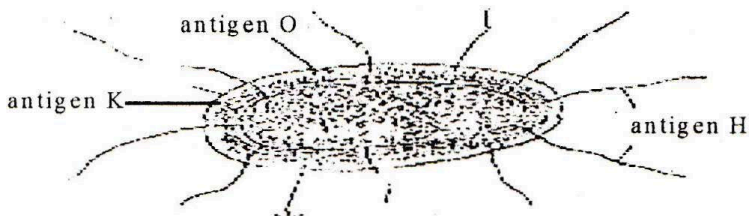
Peneliti pertama yang menemukan bakteri penyebab demam tifoid ialah Eberth pada tahun 1880 sehingga disebut sebagai *Eberthella typosa* atau *S. typhi* (Widodo *et al.*, 1989). *S. typhimurium* dan *S. typhi* termasuk bakteri gram negatif, tidak berspora, bergerak dengan flagela peritrik, dan fakultatif anaerob yang secara khas mengfermentasi glukosa dan manosa tetapi tidak mengfermentasi

Laktosa dan sukrosa. Bakteri ini berukuran antara 0,6 μm - 0,7 μm x 2,0 μm termasuk genus *Salmonella* dan famili *Enterobacteriaceae* (Guerrant *et al.*, 1987).

Bakteri *S. typhimurium* merupakan bakteri enterik yang dapat beradaptasi pada kondisi lingkungan yang bebas, dapat hidup pada vertebrata berdarah panas maupun vertebrata berdarah dingin (Linliu *et al.*, 1992). *Salmonella* mudah mati oleh panas, tetapi dapat bertahan hidup berminggu-minggu dalam air atau es. Di dalam air bersih bakteri ini tidak mengalami multiplikasi, tetapi dengan adanya oksigen dan bahan-bahan organik dalam air dapat membantu pertumbuhannya sehingga dapat hidup lebih lama (Maegraith *et al.*, 1977).

Bakteri *Salmonella* memiliki antigen O (*antigen somatik*), yaitu suatu senyawa yang terdiri atas lipopolisakarida yang terletak pada dinding sel bagian luar, antigen H (*antigen flagella*), merupakan protein yang berasal dari flagela bakteri. Beberapa

Salmonella termasuk *S. typhi* juga memiliki antigen Vi (*antigen permukaan*) berupa senyawa polisakarida yang melindungi permukaan sel. Antigen Vi pada umumnya ber-kaitan dengan sifat virulensi suatu bakteri. Bakteri yang kehilangan antigen O dihubungkan dengan perubahan morfologi dari koloni halus menjadi koloni kasar, sedangkan bakteri yang kehilangan antigen H ditandai dengan kehilangan kemampuan gerakannya. Struktur antigen bakteri famili *Enterobacteriaceae* dapat dilihat pada gambar 2.1.



Gambar 2.1. Struktur antigen bakteri famili *Enterobacteriaceae*. Antigen pada famili ini terdiri atas antigen O (*antigen somatik*), antigen K (*kapsular*) dan antigen H (*flagella*) (Sumber: Jawetz *et al.*, 1984).

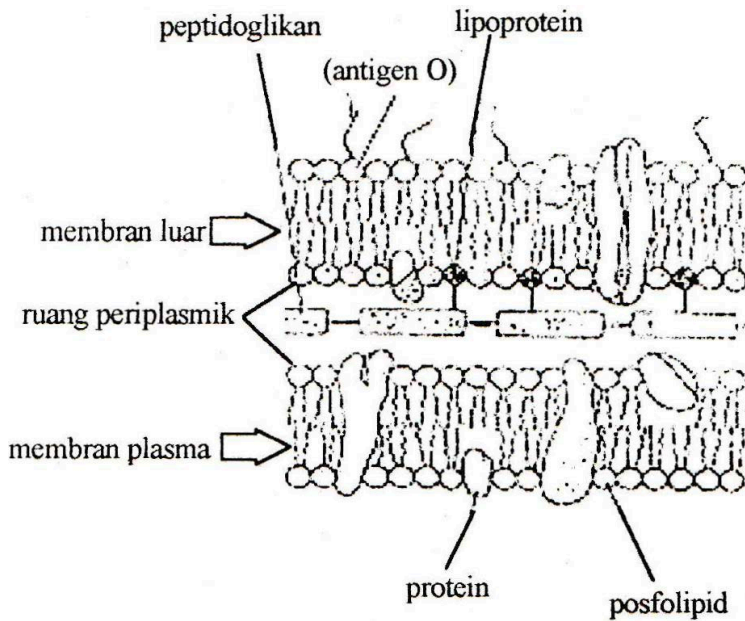
Bakteri *S. typhimurium* dan *S. typhi* merupakan bakteri patogen terhadap sel inangnya. Bakteri *S. typhimurium* menyebabkan penyakit mirip tifoid pada mencit, sedangkan bakteri *S. typhi* menyebabkan penyakit tifoid pada manusia. Manusia merupakan tempat penampungan sesungguhnya dan satu-satunya *true reservoir* bakteri *S. typhi*. Dosis infeksi rata-rata bagi manusia untuk menimbulkan infeksi adalah 10^5 - 10^9 organisme *S. typhi*. *S. typhimurium* merupakan bakteri penyebab penyakit mirip tifoid pada mencit, tetapi tidak menyebabkan penyakit pada manusia, bakteri ini dapat digunakan sebagai model untuk mempelajari penyakit tifoid pada manusia (Dorman *et al.*, 1992).

S. typhimurium dan *S. typhi* termasuk sel prokariot, dengan struktur sel terdiri atas tiga bagian yaitu bagian sebelah dalam dinding seli, dinding sel dan bagian sebelah luar dinding sel. Bagian sebelah dalam dinding sel terdiri atas mesosom, ribosom, sitoptasma dan daerah inti. Dinding sel terdiri atas

membran plasma, ruang periplasma, dan membran luar. Senyawa yang menyusun membran plasma pada umurnya adalah protein dan fosfolipid. Pada ruang periplasma terdapat senyawa peptidoglikan yang tersusun dari *N-Asetilmuramat* dan *N-asetilglukosamin*. Sedangkan membran luar sel disusun atas senyawa-senyawa lipoprotein, fosfolipid, dan lipopolisakarida. Bagian sebelah luar dinding sel terdiri atas *kapsula*, *flagela*, dan pili. Struktur dinding sel bakteri gram negatif dapat dilihat pada gambar 2.2.

2. Patogenesis Demam Tifoid

Demam tifoid adalah penyakit infeksi yang disebabkan oleh *S. typhi*. Penyakit ini ditandai oleh demam, toksemia, keluhan-keluhan dan gejala-gejala abdominal yang dapat menjurus kepada pendarahan atau perforasi usus, *splenomegali*, serta sering pula ditemukan *erupsi* pada kulit (Maegraith *et al.*, 1977).



Gambar 2.2 Struktur dan komponen kimia dinding sel bakteri gram negatif. Dinding sel terdiri atas tiga bagian yaitu: membran plasma (protein dan fosfolipid), ruang periplasma (petidoglikan), dan membran luar (lipoprotein, fosfolipid, dan lipopolisakarida) (sumber: Tortora *et al.*, 1986).

Demam tifoid yang terjadi pada manusia ditentukan oleh beberapa faktor termasuk jumlah bakteri, keasaman lambung, gerakan usus, virulensi, dan kondisi tubuh seseorang. Bakteri *S. typhi*

memasuki tubuh manusia melalui mulut, tetapi sampai saat ini masih belum jelas bagaimana mekanisme bakteri tersebut menembus dinding usus dan masuk ke dalam peredaran darah. Bakteri *S. typhi* setelah masuk melalui lambung dengan cepat menembus mukosa usus tanpa mengadakan multiplikasi terlebih dahulu. Bakteri mencapai kelenjar getah bening mesentrik, kemudian melalui *ductus thoracicus*, masuk ke dalam aliran darah. Pada penderita terjadi *bakteriemia* sementara, karena bakteri tersebut segera ditangkap oleh sel-sel dalam sistem retikuloendotelial limpa, hati, sumsum tulang, dan organ lainnya. Pada saat ini darah penderita masih tetap steril, tetapi setelah terjadinya multiplikasi sesuai masa inkubasi penyakit antara 10-14 hari baru terjadi persaingan antara sel tuan rumah dan sel bakteri, apabila tubuh manusia tidak bisa mengatasi multiplikasi bakteri yang terlalu banyak, maka sejumlah bakteri masuk ke dalam aliran darah dan menimbulkan gejala-gejala demam tifoid (Maegraith *et al.*, 1977).

3. Gen *ruv*

Bakteri *Salmonella* sangat penting secara medis, karena bakteri ini memiliki sifat patogen terhadap sel inangnya. Bakteri *Salmonella* sangat erat kekerabatannya dengan bakteri *E. coli*, yaitu termasuk ke dalam satu famili *Enterobacteriaceae*. Pada umumnya galur *E. Coli* tidak berbahaya terhadap mamalia, sedangkan *Salmonella* bersifat patogen terhadap mamalia (Ochman *et al.*, 1990).

Bakteri *E. coli* K-12 memiliki tiga gen *ruv* yaitu gen *ruvA*, gen *ruvB*, dan gen *ruvC*. Gen *ruv* pada *E. Coli* K-12 terletak di sekitar 41,6 menit pada peta genetiknya. Produk gen *RuvA*, *RuvB* dan *RuvC* bakteri *E. coli* dibutuhkan untuk merekombinasi genetik dan rekombinasi perbaikan kerusakan DNA (Connolly *et al.*, 1992). Gen *ruvA*, *ruvB*, dan *ruvC* mempunyai aktivitas mengatalisis *branch migration* dan pada pemisahan *holliday junction intermediate* dalam rekombinasi. Protein *RuvA*, dan

RuvB dikode dan diregulasi oleh operon SOS (Mandal *et al.*, 1993).

Secara *in vitro*, protein *RuvA* berinteraksi spesifik dengan *holliday junction* dengan aktivitas yang tinggi dan secara bersama-sama dengan *RuvB* (sebuah ATPase), meningkatkan pergerakan DNA secara terus-menerus. Proses pergerakan ini dikenal dengan *branch migration*. Pengikatan protein *RuvA* dan *RuvB* pada *holliday junction* sangat penting untuk membentuk struktur DNA hetero dupleks. Protein *RuvC* dapat berikatan secara bebas dengan *RuvA* dan *RuvB*, terikatnya protein *RuvC* akan menaikkan resolusi pemutusan ikatan pada *intermediate recombination* oleh pemutusan *endonucleolytic* spesifik pada *holliday junction* (Connolly *et al.*, 1992). Protein *RuvA* E.coli K-12 merupakan *endonuclease* yang dapat memisahkan *holliday intermediate* dan membetulkan kerusakan dalam rekombinasi genetik dan perbaikan DNA

dengan cara menginaktivasi *RuvAB* atau *RuvC* (Mahdi *et al.*, 1996).

4. Koleksi Genom

Pada pembuatan koleksi parsial genom *S. typhimurium* akan dibahas: DNA sisipan, DNA vektor, dan kloning. Koleksi genom adalah koleksi klon plasmid atau lisat faga, yang mengandung molekul DNA rekombinan. Molekul DNA rekombinan terdiri atas molekul DNA sisipan dan molekul DNA vektor. Molekul DNA sisipan dalam suatu koleksi genom memberikan informasi genetik suatu organisme. Probabilitas untuk menemukan gen yang spesifik pada koleksi genom tergantung panjangnya DNA sisipan dan kompleksitas genom. Semakin besar ukuran DNA sisipan dan semakin kompleks genom maka klon yang ukurannya spesifik semakin banyak yang akan diperlukan dalam informasi genetik (Winnacker, 1987).

a. DNA sisipan

Tahap awal yang dilakukan pada pembuatan koleksi genom yaitu mengisolasi dan memurnikan DNA kromosom *S. typhimurium*. Proses selanjutnya DNA kromosom dipotong secara parsial dengan menggunakan enzim restriksi *Sau3AI*, sehingga menghasilkan fragmen-fragmen DNA yang dapat diklon dalam vektor yang sesuai. Jika koleksi genom mengandung fragmen DNA yang dihasilkan dari pemotongan parsial maka fragmen akan tumpang tindih dan koleksi akan memberikan tidak hanya satu struktur gen, tetapi juga gen-gen lainnya. Pada proses ini yang harus diperhatikan adalah untuk memperoleh ukuran fragmen DNA random yang sesuai dan cocok dengan vektor. Bila hal ini tidak dipertimbangkan, maka proses kloning akan mengalami kesulitan. (Winnacker, 1987).

Jumlah urutan nukleotida sisi pengenal enzim restriksi tertentu pada molekul DNA dapat dihitung

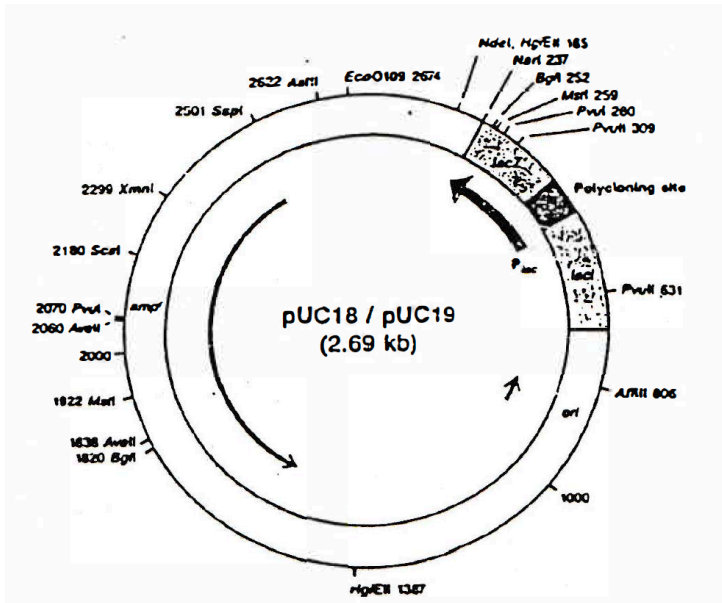
secara matematik. Enzim restriksi yang memiliki 4 nukleotida sisi pengenaan akan mengenali satu kali setiap 256 nukleotida, sedangkan enzim restriksi yang memiliki 6 nukleotida sisi pengenal akan mengenali satu kali setiap 4096 nukleotida. Jadi enzim restriksi dengan 4 nukleotida sisi pengenalan rata-rata memotong DNA 16 kali lebih besar dari pada enzim yang mempunyai 6 nukleotida sisi pengenalan (Boulnois, 1987). Oleh karena itu, untuk keperluan pembuatan koleksi genom enzim restriksi dengan 4 sisi pengenalan akan lebih menguntungkan daripada menggunakan enzim restriksi dengan 6 sisi pengenalan, selanjutnya pemotongan parsial dilakukan dengan mengatur variasi waktu inkubasi atau variasi konsentrasi enzim.

b. Vektor

Persyaratan yang paling penting bagi setiap vektor kloning adalah memiliki sarana untuk mengadakan replikasi dalam sel inang. Pemilihan vektor untuk keperluan kloning harus memperhatikan ukuran fragmen DNA yang akan diligasi, efisiensi transformasi yang tinggi, penanda seleksi yang mudah diamati untuk sel transforman dan rekombinan (Brown, 1991). Apabila ukuran fragmen DNA lebih besar dari 40 kb, maka vektor λ dan kosmid dapat digunakan secara efektif. Fragmen DNA sisipan yang ukurannya kurang dari 10 kb, maka sebaiknya menggunakan vektor plasmid (Winnacker, 1987). Beberapa vektor plasmid yang sering digunakan untuk keperluan kloning antara lain pBR122, pBR325, dan pUC19, semua vektor tersebut berasal dari bakteri *E. coli* K-12.

Vektor pUC 19 adalah turunan dari vektor pBR322, membawa gen resistensi antibiotik ampicilin

dan satu gen *lacZ* yang mengode enzim β galaktosidase. Enzim ini merupakan salah satu enzim yang berfungsi memecah laktosa menjadi glukosa dan galaktosa. Enzim β galaktosidase dikode oleh gen *lacZ* yang terletak pada kromosom *E. coli*. Peta vektor kloning pUC 19 dapat dilihat pada gambar 2.3.



Gambar 2.3 Peta vektor kloning pUC 19 dan daerah multi kloningnya. Vektor ini mempunyai gen resistensi ampicilin (amp^r), gen *lacZ* yang digunakan untuk menyisipkan fragmen DNA pada proses cloning (sumber: Maniatis *et al.*, 1989).

c. Kloning

Proses cloning gen secara umum melalui langkah-langkah sebagai berikut:

- (1) Fragmen DNA yang akan di klon (DNA sisipan) disisipkan pada molekul DNA vektor.
- (2) DNA vektor bertindak sebagai wahana membawa gen masuk ke sel tuan rumah melalui proses transformasi.
- (3) Di dalam sel tuan rumah DNA vektor dapat mengadakan replikasi.
- (4) ketika sel membelah, kopi molekul DNA rekombinan diwariskan pada progeny dan terjadi replikasi vektor selanjutnya.
- (5) Setelah terjadi pembelahan sel maka dihasilkan koloni atau klon sel tuan rumah yang identik (Brown, 1991).

Untuk mencapai tujuan tersebut tahap awal yang dilakukan adalah ligasi antara molekul vektor dengan molekul DNA sisipan. Teknik ligasi kedua

molekul tersebut dapat dilakukan dengan beberapa cara yaitu:

- 1) Fragmen DNA sisipan yang mempunyai ujung lengket diligasi dengan vektor yang memiliki ujung lengket, cara ini lebih efisien karena ujung-ujung lengket yang komplemen akan saling berikatan.
- 2) Ligasi antara fragmen yang berujung lengket dengan yang berujung tumpul memerlukan molekul tambahan yaitu linker atau adaptor.

Linker adalah DNA untai ganda pendek (oligonukleotida) yang telah diketahui urutan nukleotidanya dan keduanya berujung tumpul, tetapi memiliki sisi pengenal dengan enzim yang menghasilkan ujung lengket. Ligasi DNA akan melekatkan linker pada ujung tumpul DNA, bila dipotong dengan enzim restriksi yang telah ditentukan maka akan menghasilkan fragmen DNA yang berujung lengket. Seperti pada linker, adaptor juga merupakan oligonukleotida yang pendek, tetapi

adaptor disintesis menghasilkan satu ujung tumpul dan satu ujung lengket, hal ini bertujuan untuk menyamburtg ujung tumpul adaptor dengan ujung tumpul fragmen DNA, sehingga menghasilkan molekul baru yang berujung lengket. Setelah proses ligasi selanjutnya dilakukan transformasi.

Proses transformasi yang terjadi di alam bukan merupakan proses utama bagi bakteri untuk mendapatkan informasi genetik. Hal ini terlihat bahwa di dalam laboratorium hanya sedikit spesies yang dapat di transfonnasi. Kemajuan transfonnasi terjadi pada tahun 1970, ketika sel *E. coli*, dimasukkan ke dalam larutan kalsium klorida 50 mM. Perlakuan dengan kalsium klorida ini menyebabkan perubahan tertentu pada dinding sel organisme sehingga meningkatkan probabilitas masuknya DNA ke dalam sel. Pemasukan DNA kedalam sel distimulasi oleh kenaikan temperatur pada suhu 42°C dalam waktu singkat (*heat shock*) (Brown, 1991).

5. Seleksi koleksi genom

Transforman adalah sel yang telah mengalami proses transformasi, sehingga mengandung plasmid tertentu. Pada umumnya vektor kloning dirancang sedemikian rupa sehingga insersi DNA sisipan pada vektor akan merusak integritas satu di antara gen-gen yang terdapat pada plasmid tersebut, misalnya penyisipan DNA sisipan pada gen *LacZ*, menyebabkan gen tersebut tidak mampu mensintesis enzim β galaktosidase. Seleksi pada tahap ini merupakan seleksi secara fenotifik. Seleksi transforman menggunakan vektor pUC 19 meliputi seleksi resistensi antibiotik ampisilin dan diikuti dengan seleksi terhadap aktivitas enzim β galaktosidase. Sel yang mengandung pUC 19 akan mampu hidup di media yang mengandung ampisilin dan mampu mensintesis enzim β galaktosidase, dengan demikian bila sel transforman dihidupkan pada media yang mengandung IPTG dan X-gal akan berwarna biru. Sel yang mengandung DNA

rekombinan juga resisten terhadap antibiotik ampisilin, tetapi tidak mampu mensintesis enzim β galaktosidase, dengan demikian bila sel transforman dihidupkan pada media yang mengandung IPTG dan X-gal koloni tidak berwarna. Metoda lain yang dapat digunakan untuk menyeleksi gen pada koleksi genom dapat dilakukan dengan beberapa metoda seperti: hibridisasi koloni, hibridisasi asam nukleat (Brown, 1991).

Salah satu metoda yang digunakan untuk menyeleksi koleksi genom adalah dengan cara koloni hibridisasi. Koloni hibridisasi mula-mula diperkenalkan oleh Grunstein dan hognes (1975). Koloni yang diperoleh dari proses transformasi kemudian ditransfer dari cawan agar ke filter nitro selulosa, selanjutnya koloni yang tumbuh pada filter didenaturasi dengan larutan alkali. Filter selulosa kemudian dicuci dan dikeringkan lalu di inkubasi dengan probe yang telah di label dengan senyawa radioaktif, bila ada urutan nukleotida yang

mempunyai homologi dengan probe maka probe akan berikatan pada DNA filter, kemudian dilakukan autoradiografi maka akan kelihatan noda hitam selanjutnya noda hitam tersebut dihubungkan pada koloni master plate maka akan diperoleh koloni yang diinginkan (Winnacker, 1987).

6. *Polymerase Chain Reaction*

Polymerase Chain Reaction (PCR) adalah teknik amplifikasi DNA secara *in vitro*. Amplifikasi DNA pada proses PCR dilakukan menggunakan oligonukleotida yang disebut primer. Primer merupakan molekul DNA untai tunggal yang panjangnya sekitar 18 pb - 24 pb yang urutannya adalah komplemen dengan urutan nukleotida DNA templat. Proses PCR memerlukan sepasang primer yang akan membatasi fragmen DNA yang akan diamplifikasi (Newton dan Graham, 1994). Melalui proses PCR satu molekul DNA dapat diamplifikasi hingga 10^6 - 10^8 lebih banyak jika dibandingkan

terhadap konsentrasi awalnya (Noer, *et al.*, 1993). Proses PCR memerlukan tiga tahap yaitu: 1) Denaturasi DNA templat, 2) reaksi *annealing* yaitu penempelan primer pada DNA templat untai tunggal dan 3) Reaksi polimerisasi rantai DNA dengan bantuan enzim DNA polimerase. Banyaknya fragmen DNA yang dapat diamplifikasi pada proses PCR adalah $(2-2n)^x$, dimana n adalah jumlah siklus, $2n$ adalah hasil pertama pada siklus pertama dan hasil kedua pada siklus kedua dengan panjang tertentu dan x adalah jumlah molekul templat (Newton dan Graham, 1994).

7. Sekuensing

Sekuensing dilakukan untuk menentukan urutan nukleotida koleksi genom. Penentuan urutan nukleotida menggunakan metoda dideoxy-Sanger berdasarkan pada reaksi terminasi nukleotida. Nukleotida yang dipergunakan untuk perpanjangan primer pada sintesis DNA secara *in vitro* adalah

2'deoksinukleosida (dNTP), sedangkan basa yang dipergunakan untuk proses terminasi adalah nukleosida trifosfat (ddNTP). Gugus hidroksil pada gula ribosa ddNTP direduksi pada ujung 2' dan ujung 3'. Hal ini menyebabkan DNA polimerase tidak dapat membentuk ikatan fosfodiester dengan dNTP atau ddNTP berikutnya, sehingga reaksi polimerisasi berhenti. Penentuan urutan nukleotida pada penelitian ini menggunakan sekuensing *KIT.ABI Prisma*. Sekuensing kit mengandung dua bagian yaitu: 1) Amplifikasi DNA melalui proses PCR, 2) dan Siklus Taq sekuensing, siklus ini menggunakan Taq Dyedeory terminator sekuensing kit. Selanjutnya DNA dimurnikan lalu dielektroforesis pada alat sekuensing *otomatis Aplied Biosystems DNA 373 Sequencer*.

BAB III TEKNIK DAN METODE KLONING GEN

Pada penelitian ini digunakan pendekatan koleksi parsial genom *S. typhimurium*. Pendekatan tersebut dilakukan dengan menentukan urutan nukleotida beberapa klon dari koleksi parsial genom *S. typhimurium*. Pada Bab III ini akan dibahas: Polymerase Chain Reaction (PCR), isolasi DNA kromosom, DNA sisipan, DNA vektor, transformasi, isolasi DNA plasmid rekombinan, karakterisasi DNA plasmid rekombinan, sekuensing, dan analisis homologi dengan data yang ada pada *GenBank*.

1. *Polymerase Chain Reaction (PCR)*

Bakteri yang digunakan pada penelitian ini adalah *S. typhimurium* galur LT2. Proses PCR yang dilakukan ada beberapa tahap yaitu : persiapan DNA templat, amplifikasi DNA templat, dan elektroforesis hasil PCR pada gel agarosa.

a. Persiapan DNA templat

Pada penelitian ini DNA templat yang digunakan untuk proses PCR berasal dari bakteri *S. typhimurium*, *S. typhi*, dan *E. coli*. Persiapan larutan DNA templat dilakukan dengan dua cara yaitu:

- (1) Larutan DNA templat *S. typhimurium* dilakukan dengan cara isolasi DNA kromosom dengan menggunakan KIT Promega, yang akan dijelaskan pada subbab berikutnya.
- (2) Larutan DNA templat *S. typhi* dan *E. coli* dilakukan dengan cara lisis sel.

Tahap awal yang dilakukan pada proses lisis sel adalah menumbuhkan masing-masing koloni tunggal bakteri *S. typhi* dan *E. coli* dalam 50 mL media Luria-Bertani (LB) cair yang berisi bacto tryptone 1 %, yeast extract 0,5% , dan NaCl 1% (Sambrook *et al.*, 1989). Kemudian diinkubasi pada suhu 37°C dengan kecepatan 200 rpm selama satu malam. Selanjutnya diambil 1 mL biakan tersebut dan dimasukkan kedalam tabung Eppendorf Lisis

dilakukan dengan menambahkan 1 00 μL bufer lisis 10x yang mengandung Tris-HCl 50 mM pH 8,5, EDTA 1 mM pH 8,5, Tween 20 0,5%, dan proteinase-K 0,2 mg/mL (Noer *et al.*, 1994). Campuran reaksi selanjutnya diinkubasi pada suhu 50°C selama 1 jam, setelah itu dipanaskan pada suhu 95°C selama 3 menit, dan disentrifugasi. Supernatannya selanjutnya digunakan sebagai templat PCR.

b. Amplifikasi DNA templat

Proses selanjutnya adalah mempersiapkan campuran komponen-komponen yang diperlukan dalam reaksi PCR. Untuk mempermudah proses ini campuran tersebut dibuat di dalam satu tabung sebagai master mix. Untuk satu kali reaksi PCR master mix yang harus dibuat adalah sebagai berikut ke dalam tabung Eppendorf 1,5 mL dimasukkan 31,75 μL ddH₂O, 5 μL bufer PCR 10 x pH 8,3 (Tris-HCl 10 mM, MgCl₂ 1,5 mM, dan KCl 59 mM), 1 μL dNTP yang terdiri atas dGTP, dATP, dTTP, dan dCTP

dengan konsentrasi masing-masing 200 μM , 1 μL primer rfb1 dan rfb2 masing-masing mengandung 30 pmol, dan 1,25 unit *Taq DNA polymerase* (Noer *et al.*, 1994). Campuran master mix ini selanjutnya dihomogenkan dengan pipet. Kemudian ke dalam satu tabung Eppendorf dicampurkan 10 μL DNA templat hasil lisis dengan 40 μL master mix, lalu tambahkan 1 tetes parapin. Tahap selanjutnya adalah proses amplifikasi di dalam mesin *DNA Thermal Cycler*. Pada penelitian ini proses PCR dilakukan sebanyak 30 siklus, setiap siklus terdiri atas denaturasi pada suhu 94 $^{\circ}\text{C}$ selama , 1 menit, *annealing* pada suhu 50 $^{\circ}\text{C}$ selama 1 menit, dan polimerisasi pada suhu 72 $^{\circ}\text{C}$ selama 1 menit.

c. Elektroforesis gel agarosa

Hasil PCR yang diperoleh selanjutnya dielektroforesis pada gel agarosa, untuk mengetahui ukuran fragmen DNA yang dihasilkan. Elektroforesis gel agarosa adalah salah satu cara yang digunakan

untuk memisahkan dan menentukan ukuran fragmen-fragmen DNA (Sambrook *et al.*, 1989). Untuk pengecekan DNA hasil PCR digunakan gel agarosa 2%. Gel agarosa 2% dibuat dengan melarutkan 0,8 gram bubuk agarosa ke dalam 40 mL TAE 1x (Tris-HCl 40 mM, EDTA 10 mM pH 8,0) (Sambrook *et al.*, 1989). Campuran ini dipanaskan sampai mendidih, kemudian didinginkan sampai suhu 60°C, larutan agarosa selanjutnya dituangkan pada cetakan yang telah berisi sisir, didiamkan sampai memadat. Pengecekan hasil PCR dilakukan dengan cara mencampurkan 10 μ L DNA hasil PCR dengan 2 uL loading buffer (sukrosa 50%, EDTA 0,1 M, dan bromfonol biru 0,1%, pH 8,0) Campuran tersebut dimasukkan ke dalam sumur gel yang telah dibuat dalam cetakan alat *mini subTMDNA elektroforesis cell* (Bio-Rad) yang telah berisi larutan TAE 1x. Kemudian alat ini dihubungkan dengan arus listrik pada tegangan 70 volt selama 1 jam. Hasil elektroforesis selanjutnya direndam dalam larutan etidium bromida 0,5ug/mL Penampakan hasil

elektroforesis dilakukan dengan bantuan sinar UV, standar ukuran DNA yang digunakan adalah pUC19 yang dipotong dengan enzim Hinf I.

2. Isolasi DNA Kromosom

Isolasi DNA kromosom adalah tahap penting yang harus dilakukan, karena DNA kromosom merupakan sumber gen untuk keperluan kloning. Adapun tahap-tahapnya adalah sebagai berikut: Kultur biakan yang telah dikocok semalam dengan kecepatan 200 rpm pada suhu 37°C diambil 1 mL dan dimasukkan ke dalam Eppendorf. Kemudian disentrifugasi 14000 rpm dengan jari-jari rotor 7 cm selama 1 menit, supernatan dibuang, dan ditambahkan 600 µL larutan *Nuclei lysis* (untuk selanjutnya dipergunakan alat sentrifugasi dengan jari-jari rotor 7 cm). Proses selanjutnya dihomogenkan dengan pipet sampai sel teruspensi lalu diinkubasi pada suhu 80 °C selama 5 menit untuk melisis sel, kemudian dinginkan pada suhu kamar.

Setelah itu ditambahkan 3 μL larutan *RNase* ke lisat sel, tabung eppendorj dibolak-balik sebanyak 25 kali. Campuran diinkubasi pada suhu 37 °C selama 15 menit, kemudian didinginkan pada suhu kamar. Proses selanjutnya ditambahkan 200 μL larutan *Protein precipitation*, selanjutnya dilakukan *vortex* terhadap campuran dengan kecepatan tinggi selama 20 detik, kemudian didiamkan dalam es selama 5 menit. Setelah itu disentrifugasi 14000 rpm selama 3 menit Supernatan dipindahkan ke Eppendorf steril, kemudian ditambahkan 600 μL isopropanol. Campuran diinversi sampai seperti membentuk benang-benang strand DNA, lalu disentrifugasi 14000 rpm selama 2 menit. Supernatan dibuang dan ditambahkan 600 μL etanol 70% kemudian campuran dibolak-balik beberapa kali, lalu disentrifugasi 14000 rpm selama 2 menit, lalu etanolnya dibuang dan keringkan pelet DNA pada suhu kamar. Pelet DNA dilarutkan dengan 100 μL Larutan DNA rehidration, inkubasi pada 65°C selama 1 jam atau *overnight* pada suhu kamar, kemudian

DNA kromosom di Simpan pada suhu -20°C (Promega, Genomic DNA Purification KIT. Cat. Al 120).

Hasil isolasi DNA kromosom selanjutnya diukur konsentrasinya menggunakan alat spectrojhotometer UV-120-02. Larutan DNA kromosom *S. typhimurium* diambil 5 μL kemudian diencerkan sampai volume akhir 1 mL dan dimasukkan ke dalam kuvet DNA, konsentrasinya di ukur dengan melihat besarnya absorbansi pada panjang gelombang 260 nm. Konsentrasi DNA yang diperoleh dapat dihitung sebagai berikut: $A_{260} \times 11000/10 \times 50 \mu\text{g/mL}$. Kemurnian DNA kromosom dapat ditentukan dengan membandingkan nilai absorbansi pada panjang gelombang 260nm dengan nilai absorbansi pada panjang gelombang 280 nm. Nilai absorbansi $\lambda_{260}/\lambda_{280}$ untuk DNA murni sama dengan atau lebih besar dari 1,8 (Brown, 1987).

3. DNA sisipan

Keberhasilan untuk menghasilkan koleksi genom yang representatif, memerlukan ukuran molekul DNA sisipan yang sesuai dengan molekul DNA vektor (Winnacker, 1987). DNA sisipan dapat dipersiapkan dengan cara pemotongan parsial menggunakan enzim restriksi *Sau3AI*. Pemotongan parsial menggunakan enzim restriksi harus dioptimasi dahulu pada skala kecil, selanjutnya dapat dilakukan pemotongan parsial pada skala besar untuk pembuatan koleksi genom. Optimasi pemotongan DNA sisipan skala kecil dilakukan dengan menggunakan variasi konsentrasi enzim *Sau3AI*. Proses ini dilakukan dengan prosedur sebagai berikut. Ke dalam masing-masing tabung Eppendorf (diperlukan 6 buah Eppendorf) dimasukkan 2 μ L DNA kromosom *S. typhimurium* (mengandung 1 μ g DNA kromosom *S. typhi murium*). Selanjutnya ke dalam masing-masing Eppendorf ditambahkan 3 μ L bufer 10 x *Sau3AI* (Tris-HCl 10 mM pH 7,5, MgCl₂ 7 mM

dan NaCl 100 mM). Proses selanjutnya ditambahkan enzim *Sau3AI* (Amersham) pada setiap masing-masing tabung mulai dari tabung nomor 2 sampai tabung nomor 6 dengan volume: 0,5 μL , 1, μL , 1,5 μL , 2,5 μL , 3 μL , 3,5 μL , dengan konsentrasi enzim *Sau3AI* 0,5U/ μL . Kemudian pada tiap-tiap Eppendorf ditambahkan ddH₂O hingga volume akhir 30 μL . Eppendorf nomor satu digunakan sebagai kontrol terhadap pemotongan parsial DNA kromosom *S. typhimurium*. Proses selanjutnya dilakukan inkubasi pada 37°C selama 30 menit. Reaksi dihentikan dengan penambahan 1 μL larutan EDTA 0,5 M dan 10 μL loading buffer. Hasil optimasi pada pemotongan skala kecil, selanjutnya dapat dipergunakan untuk pemotongan parsial pada skala besar. Pada penelitian ini pemotongan parsial skala besar dilakukan dengan cara 50 μL DNA kromosom *S. typhimurium* (25 μg DNA kromosom *S. typhimurium*), dimasukkan ke dalam satu tabung Eppendorf, lalu ditambahkan 75 μL bufer 10 x *Sau3AI*, dan 12,5 μL enzim *Sau3AI* (2 unit/ μL),

kemudian tambahkan ddH₂O, hingga volume akhir 750 μ L. Proses selanjutnya sama seperti yang dilakukan pada pemotongan parsial skala kecil (Promega, The Source of Discovery, 1996).

4. Permurnian fragmen DNA

Hasil pemotongan parsial DNA kromosom selanjutnya dielektroforesis pada gel agarosa, sebagai standar ukuran DNA digunakan DNA λ -yang dipotong dengan enzim *Hind* III. Fragmen DNA yang berukuran 4-5 kb pada gel agarosa dipotong dan dimurnikan dengan cara sebagai berikut: Gel agarosa yang telah dipotong dimasukkan ke dalam tabung Eppendorf, kemudian ditambahkan 3 kali volume NaI 6 M, lalu diinkubasi pada suhu 55 °C selama 5 menit. Setelah gel mencair ditambahkan 5 μ L glass powder untuk 1 μ g DNA, bila pemurnian lebih dari 1 μ g DNA, maka ditambahkan 2 μ L glass powder setiap penambahan 1 μ g DNA. Campuran disentrifugasi dengan menggunakan mikrosentrifugasi type 5415 C

Eppendorf dengan kecepatan 3000 rpm selama 10 menit supernatan dibuang. Proses selanjutnya merupakan proses presipitasi yaitu glass powder yang berisi pelet DNA dicuci dengan 50% etanol dingin (rinse buffer), sebanyak 5 μ L glass powder dicuci dengan 250 μ L rinse buffer. Larutan disentrifugasi dengan mikrosentrifugasi type 5415 C Eppendorf dengan kecepatan 3000 rpm selama 1 menit lalu supernatan dibuang. Ulangi prosedur presipitasi sampai dua kali, selanjutnya keringkan glass powder yang mengandung pelet DNA pada konsentrator (*Concentrator type 5301 Eppendorf*). Selanjutnya di tambahkan larutan TE sebanyak 2 kali volume glass powder, kemudian diinkubasi pada suhu 55 °C selama 5 menit. Pindahkan larutan DNA pada tabung Eppendorf steril dan simpan pada suhu 4°C (*USBioclean TM MP Amersham life Science*).

5. DNA vektor

Molekul DNA vektor yang digunakan pada penelitian ini adalah plasmid pUC19, yang berukuran 2,69 kb. Vektor ini selanjutnya dipotong dengan enzim restriksi *Bam*HI, hasil pemotongan dengan enzim ini akan komplemen dengan DNA sisipan hasil pemotongan dengan enzim *Sau*BAI. Hasil pemotongan vektor pUC19 dielektroforesis pada gel agarosa akan menunjukkan satu pita dengan ukuran 2,69 kb. Proses selanjutnya dilakukan defosforilasi terhadap vektor pUC 19 dan uji defosforilasi. Proses defosforilasi dilakukan dengan tujuan untuk menghindari terjadinya ligasi antara dirinya sendiri (self ligation) (Sambrook *et al.*, 1989).

a. Defosforilasi vektor

Proses defosforilasi dilakukan sebagai berikut. Sebanyak 10 µg DNA plasmid pUC 19 sirkular dipotong dengan 20 unit enzim restriksi *Bam*H1 dalam waktu satu jam. Campuran DNA pUC19 hasil

pemotongan diambil kurang lebih 300 ng dan dianalisis dengan cara elektroforesis untuk mengetahui plasmid sudah terpotong sempurna. Jika plasmid sudah terpotong sempurna dirurnikan dengan ekstraksi fenol kloroform dan presipitasi dengan etanol. Larutan DNA diambil kurang lebih 200 ng disimpan pada suhu -20 °C, kemudian DNA sisa ditambahkan 15 µL bufer CIP 10 x {Tris-HCl 10 mM pH 9, KCl 50 mM, MgCl₂ 1 mM, ZnCl₂ 0,1 mM, dan gliserol 50% pH 8,0). Kemudian ditambahkan enzim *CIP* 0,2 unit dan diinkubasi pada suhu 37 °C selama 30 menit. Reaksi dihentikan dengan penambahan 3,75 µL SOS 0,5% dan larutan 1,5 µL EDTA 5mM pH 8,0 kemudian ditambahkan Proteinase-K hingga konsentrasi akhir 100 ng/µL, campuran diinkubasi pada suhu 56 °C selama 30 menit. Selanjutnya diekstraksi dengan fenol dan kloroform, kemudian dipresipitasi dengan etanol. (Sambrook et al., 1989).

b. Ligasi

Proses ligasi adalah menyambungkan fragmen DNA yang dikatalisis oleh enzim ligase. Proses ini dilakukan dengan perbandingan molar DNA sisipan dengan DNA vektor adalah 1 : 3, ligasi yang dilakukan harus ada kontrol ligasi. Kontrol ligasi yang digunakan adalah sebagai berikut:

- (1) Sejumlah 2 μL vektor pUC 19 (80 ng) tanpa didefosforilasi dimasukkan kedalam tabung eppendorf, lalu ditambahkan 1 μL bufer 10 x T4 ligase (Tris-HCl 25 mM pH 7,6, DTT 1 mM, NaCl 100 mM), dan ditambahkan 0,5 μL T4 ligase (0,5 unit). Selanjutnya ditambahkan ddH₂O hingga volume akhir 10 μL . Campuran diinkubasi pada suhu 16 °C selama 16 jam.

- (2) Ligasi vektor yang didefosforilasi dilakukan sebagai berikut: Sebanyak 2 μL DNA pUC 19 (80 ng) ditambahkan 1 μL bufer T 4 ligase 10 x yang mengandung seperti di atas, kemudian

ditambahkan 0,5 μL T4 ligase (0,5 unit}, dan ddH₂O hingga volume akhir 10 μL Lalu diinkubasi pada suhu 16 °C selama 16 jam. Ligasi DNA pUC19 dengan DNA sisipan dilakukan sebagai berikut: Sejumlah 2 μL DNA pUC 19 (70 ng) yang didefosforilasi, dicampurkan 1 μL bufer T4 ligase 10 x, 2 μL DNA sisipan (198 ng), 2 μL enzim T4 ligase (lunit) dan ditambahkan ddH₂O hingga volume akhir 20 μL . Campuran diinkubasi pada suhu 16 °C selama 16 jam (Amersham Life Science).

C. Transformasi

Pada proses transformasi, langkah awal yang harus dilakukan adalah pembuatan kompeten sel. Langkah ini dilakukan sebagai berikut: *E. coli* JM 109 ditumbuhkan pada 50 mL media LB cair selama 16-18 Jam. Sebanyak 1 00 μL biakan tersebut ditumbuhkan kembali pada 10 mL media LB cair sampai mencapai OD 0,2 pada panjang gelombang

600 nm (lihat pada sub bab isolasi DNA kromosom). Biakkan sel yang mempunyai OD 0,2 kemudian didinginkan di dalam es selama 10 menit. Selanjutnya disentrifugasi dengan mikrosentrifugasi type 5415 C dengan kecepatan 4000 rpm pada suhu 4°C, selama 10 menit. Kemudian pelet sel diresuspensi dengan 10 mL CaCl₂ 0,1 M dingin dan didiamkan dalam es selama 10 menit. Selanjutnya disentrifugasi dengan mikrosentrifugasi type 5415 C dengan kecepatan 4000 rpm pada suhu 4°C, selama 10 menit. Kemudian pelet sel diresuspensi dengan 2 mL CaCl₂ 0,1 M dingin. Kompeten sel selanjutnya dibagi-bagi pada tabung Eppendorf steril sebanyak 200 µL (Sambrook et al., 1989).

Proses selanjutnya dilakukan transformasi sel inang *E. coli* 1M 109 dengan cara memasukkan masing-masing DNA rekombinan (vektor pUC yang telah membawa DNA sisipan), dan kontrol ligasi ke dalam sel inang. Proses transformasi dilakukan sebagai berikut: Sejumlah 200 µL kompeten sel

dicampurkan dengan 70 ng DNA rekombinan, kemudian didiamkan dalam es selama 40 menit. Setelah proses tersebut segera diinkubasi dalam waterbath pada suhu 42 °C selama 3 menit (heat Shock). Setelah dilakukan *heat shock* didiamkan pada suhu ruang selama 10 menit, ditambahkan LB cair sebanyak 1 mL, dan diinkubasi 37 °C selama 45 menit. Selanjutnya transforman ditumbuhkan pada media LB yang mengandung antibiotik ampisilin dan 40 µL IPTG 20 %, dan 40 uL X-gal 20 mg/mL (Sambrook *et al.*, 1989).

6. Isolasi DNA plasmid rekombinan

Isolasi DNA plasmid rekombinan dilakukan dengan menggunakan metode skala kecil yang telah dimodifikasi pada suhu kamar (Yanti *et al.*, 1996). Metode yang dilakukan sebagai berikut: Biakan koloni tunggal plasmid rekombinan ditumbuhkan pada 50 mL LB cair selama semalam. Kemudian biakan tersebut dimasukkan ke dalam Eppendorf 1,5

mL, dan disentrifugasi dengan kecepatan 1 2000 rpm pada suhu 25 °C selama 30 detik. Selanjutnya pelet kultur diresuspensi dengan 500 µL STE (Tris-HCl 10 mM pH 8,0, NaCl 0,1 M, EDTA 1 mM pH 8,0) lalu dilakukan vortex (Sambrook *et al.* ,1989).

Campuran disentrifugasi dengan kecepatan 12000 rpm, pada suhu 25°C, selama 30 detik. Selanjutnya pelet kultur diresuspensi dengan penambahan : 300 µL larutan A (campuran 100 µL larutan I + lizozim 5 mg/ml dan 200 µL larutan II), campuran dibolak balok. Larutan I mengandung Tris-HCl 25 mM pH 8,0, EDTA 10 mM pH 8,0, glukosa 50 mM, sedangkan larutan II mengandung NaOH 0,2 N, dan SDS 1 %. Setelah ditambahkan larutan A kemudian ditambahkan 150 µL larutan III (larutan III mengandung CH₃COONa 5 M , dan Asam asetat glasial), campuran divortex selama 10 detik, didiamkan selama 5 menit. Kemudian disentrifugasi pada 12000 rpm, suhu 25°C, selama 5 menit. Supernatan diambil 400 µL, lalu diresuspensi dengan

penambahan 800 μ L etanol pa, kemudian dilakukan vorlex, dan didiamkan 2 menit pada 25 $^{\circ}$ c. Sesudah itu di sentrifugasi dengan kecepatan I 2000 rpm pada suhu 25 $^{\circ}$ C selama 5 menit. Supematan dibuang dan pelet DNA diresuspensi dengan 1 mL etanol 70%, pada suhu kamar, lalu dilakukan vortex. Kemudian larutan DNA disentrifugasi dengan kecepatan 12000 rpm, pada suhu 25 $^{\circ}$ C, selama 3 detik. Pelet DNA dilarutkan dengan 500 μ L TE (Tris-HCl 10 mM pH 8,0,dan EDTA 1 mM pH 8,0). Selanjutnya larutan DNA disimpan pada suhu -20 $^{\circ}$ C.

7. Karakterisasi DNA plasmid rekombinan

Karakterisasi DNA plasmid rekombinan dilakukan dengan cara analisis enzim restriksi. Pada pemotongan dengan satu enzim restriksi digunakan enzim *Eco* R1 (Amersham life Science). sedangkan pemotongan dengan dua enzim restriksi digunakan enzim *Kpn*I dan enzim *Xba*I, (Amersham Life Science). Pemotongan dengan Satu enzim dilakukan

sebagai berikut: Ke dalam tabung Eppendorf dimasukkan DNA sampel 10 μ L (500 ng), kemudian tambahkan 2 μ l bufer *Eco*R1 (Tris-HCl 100 mM pH 7,5, MgCl₂ 7 mM, NaCl 50 mM, 2-merkap-toetanol 7 mM, dan BSA 0,001%). Campuran ditambahkan ddH₂O hingga volume akhir 20 μ L. Selanjutnya ditambahkan enzim *Eco* R1 1 μ L (1 unit), campuran diinkubasi pada suhu 37 °C selama 3 jam. Proses pemotongan dengan 2 enzim restriksi dilakukan sebagai berikut : Ke dalam tabung Eppendorf 1,5 mL dimasukkan DNA sampel 10 μ L (500 ng), lalu ditambahkan 2 μ L bufer T (Tris-HCl 10 mM pH 7,4, KCl 50 mM, EDTA 0,1 mM, BSA 0,2 mg/mL, dan gliserol 50%). Kemudian ditambahkan ddH₂O hingga volume akhir 20 μ L, selanjutnya ditambahkan enzim *Kpn*I 1 μ L (1 unit) dan enzim *Xba*I 2 μ L (1 unit). Campuran diinkubasi pada suhu 37 °C, selama 3 jam (*Amersham Life science*, 1993}.

8. Sekuensing

Proses sekuensing dilakukan dengan alat sekuensing otomatis "*Aplied Biosystems DNA 373A Sequencer*". Proses ini meliputi dua tahap yaitu tahap pertama adalah PCR dan tahap kedua adalah pemurnian hasil PCR. Persiapan DNA templat yang digunakan untuk proses PCR dilakukan dengan isolasi DNA plasmid rekombinan. Komposisi yang diperlukan pada reaksi PCR adalah : Ke dalam tabung ependorf 0,5 mL dimasukkan 3 μ L DNA sampel (300 ng) kemudian ditambahkan 1,2 μ L primer (2,4 pmol), dan ditambahkan ddH₂O hingga volume akhir 9 μ L. Campuran reaksi ditambahkan 6 μ L DNTP (*Taq dyeDeoxy Terminator Sekuensing Kit dari ABIPRSM* yang telah mengandung bufer dan enzim *Taq polymerase*) sehingga volume total 15 μ L. Setelah tahap PCR selesai selanjutnya dilakukan tahap kedua yaitu pemurnian, dengan menggunakan kolom. Kemudian DNA dikeringkan pada kosentrator (*Concentrator type 5301 Eppendorf*). Sampel DNA

yang telah kering selanjutnya di larutkan dengan 5 uL loading buffer. Campuran DNA siap untuk dielektroforesis pada alat sekuensing "Applied Bimsystems DNA 373A Sequencer" selama 12 jam. (Perkin Elmer, I 995).

9. Analisis homologi

Hasil reaksi sekuensing merupakan urutan nukleotida fragmen DNA *S. typhimurium*, yang selanjutnya dianalisis homologinya dengan data yang ada pada di *GenBank*. Analisis homologi yang akan dilakukan adalah analisis homologi DNA dan analisis homologi Protein.

1) Analisis homologi DNA

Urutan nukleotida yang diperoleh pada reaksi sekuensing selanjutnya dilakukan scanning, dan dimasukkan ke program *word* dengan bantuan komputer urutan DNA yang ada pada program *word* dianalisis homologinya melalui bantuan internet.

Pada internet masuk ke alamat *http://www.ncbi.nlm.nih.gov*, selanjutnya masuk ke program *Blast sequence similarity*. Urutan nukleotida yang ada pada program *word* dapat di copy ke program *Blastn*, pada *GenBank* selanjutnya di submit. *GenBank* akan melakukan analisis homologi dengan fragmen DNA yang di submit.

2) Analisis Homologi Protein.

Urutan nukleotida yang ada pada program *word* dipindahkan ke program *Genmon*. Dengan bantuan program *Genmon* urutan nukleotida tersebut dapat diterjemahkan ke dalam urutan asam amino. Urutan asam amino dari program *Genmon* dipindahkan ke program *word*. Melalui program ini selanjutnya dengan cara yang sama seperti pada analisis homologi tingkat DNA, urutan asam amino di copy ke program *Blastp* pada *GenBank*, kemudian di submit.

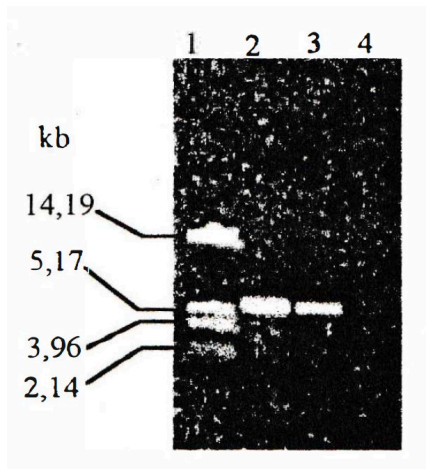
BAB IV KARAKTERISASI TRANSFORMAN

Hasil yang diperoleh pada penelitian ini disajikan dalam lima pokok bahasan, yaitu: *Polymerase Chain Reaction*, koleksi parsial *genom S. typhimurium*, seleksi koleksi genom, sekuensing, dan analisis homologi.

1. *Polymerase Chain Reaction*

Proses PCR dilakukan dengan tujuan untuk memastikan DNA yang digunakan pada penelitian ini berasal dari *S. typhimurium*. Primer yang digunakan adalah Rfb 1 dan Rfb2. Hasil PCR tersebut dapat dilihat pada gambar 4.1.

Amplifikasi DNA dilakukan sebanyak 30 siklus dengan kondisi denaturasi pada suhu 50°C selama satu menit, annealing pada suhu 94 °C selama satu menit, dan polimerisasi pada suhu 72°C selama satu menit. Proses PCR ini dilakukan bersama-sama dengan beberapa kontrol yaitu *S. typhi* dan *E. coli*.



Gambar 4.1. Elektroforesis basil PCR pada gel agarosa 2%. Pada lajur: (1) DNA pUC 19 dipotong dengan enzim restriksi *HinfI* sebagai standar ukuran DNA. (2) *S. typhimurium* menghasilkan fragmen DNA dengan ukuran 0,6 kb. (3) *S. typhi* menghasilkan fragmen DNA ukuran 0,6 kb. (4) *E. coli* sebagai kontrol negatif tidak menghasilkan fragmen DNA.

Bakteri *S. typhi* digunakan sebagai kontrol positif artinya dengan menggunakan primer rfb 1 dan rfb2 dapat mengamplifikasi DNA *S. typhi*. Bakteri *E. coli* digunakan sebagai kontrol negatif artinya primer rfb1 dan rfb2 tidak dapat mengamplifikasi DNA *E. coli*.

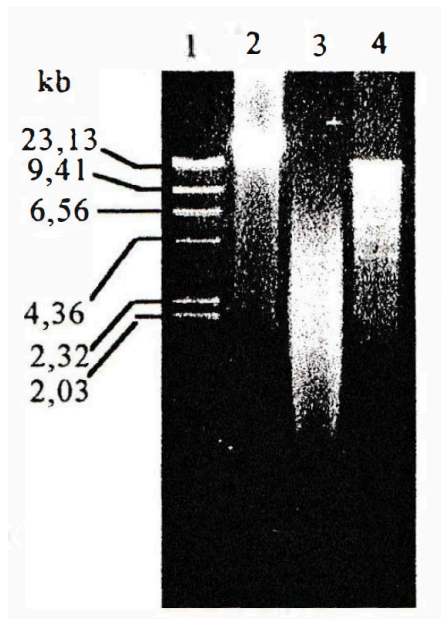
2. Koleksi Parsial Genom *S. typhimurium*

Hasil pembuatan koleksi parsial genom *S. typhimurium* akan dibahas secara bertahap sebagai berikut : hasil isolasi DNA kromosom, DNA sisipan, vektor, dan hasil transformasi.

a. Hasil isolasi DNA kromosom *S. typhimurium*

Seperti yang telah dikemukakan pada Bab III isolasi DNA kromosom dilakukan dengan menggunakan metode KIT Promega. Hasil isolasi DNA kromosom diukur konsentrasinya dengan menggunakan alat spektrofotometer UV-120-02 pada panjang gelombang 260 nm. Untuk menentukan konsentrasi dan kemudian, 5 μ L DNA kromosom *S. typhimurium* hasil isolasi kemudian diencerkan hingga volume akhir 1 mL. Selanjutnya diukur absorbansinya pada $\lambda_{260\text{nm}}$ dan pada $\lambda_{280\text{nm}}$, absorbansi pada $\lambda_{260\text{nm}}$ di peroleh sebesar 0.051 dan absorbansi pada $\lambda_{280\text{nm}}$ diperoleh 0,029. Dengan demikian konsentrasi DNA kromosom yang

diperoleh $0,051 \times 1000/5 \times 50 \text{ ng}/\mu\text{L} = 510 \text{ ng}/\mu\text{L}$.
Kemudian DNA kromosom ditentukan dengan membandingkan absorbansi pada $\lambda_{260\text{nm}}$ dengan absorbansi $\lambda_{280\text{nm}}$ yaitu $0,051/0,029$ diperoleh sebesar 1,76. Hasil isolasi DNA kromosom dapat dilihat pada gambar 4.2.



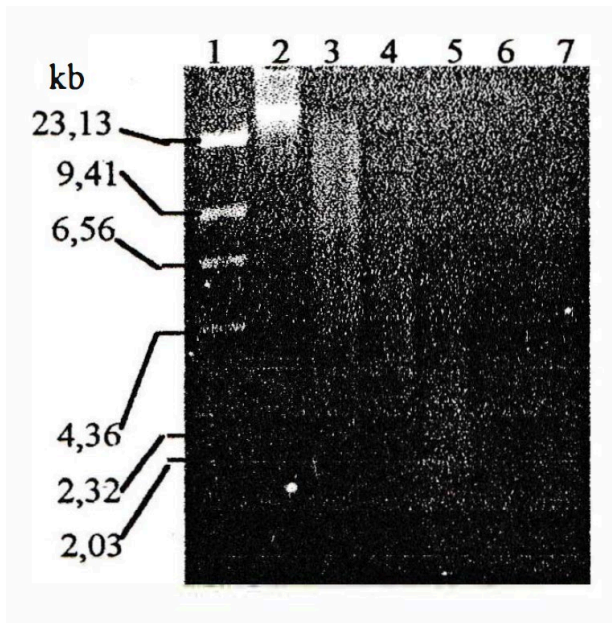
Gambar 4.2. Elektroforesis basil isolasi DNA kromosom pada gel agarosa 0,4%. Pada lajur: (1) DNA λ dipotong dengan enzim *HindIII* sebagai standar ukuran DNA. (2) DNA kromosom *uncut* (3) DNA kromosom dipotong dengan enzim restriksi *Sau3AI*. (4) DNA kromosom dipotong dengan enzim *HindIII*.

Hasil elektroforesis pada gambar 4.2 lajur (2) DNA kromosom yang digunakan sebagai kontrol pemotongan enzim restriksi. Dari hasil pemotongan dengan enzim restriksi *Sau3AI* dan *HindIII*, menunjukkan bahwa DNA kromosom hasil isolasi yang diperoleh tidak mengalami degradasi. Hal ini dapat dilihat dari hasil elektroforesis gel agarosa pita DNA kromosom kontrol dan pita DNA kromosom yang dipotong dengan enzim restriksi tidak smear. Dengan demikian hasil isolasi DNA kromosom tersebut dapat digunakan dalam pembuatan koleksi parsial genom *S. typhimurium*.

b. DNA sisipan

Penyediaan fragmen DNA sisipan dilakukan dengan cara memotong parsial DNA kromosom *S. typhimurium* dengan enzim *Sau3AI*. Pemotongan DNA kromosom tersebut mula-mula dilakukan pada skala kecil dengan tujuan untuk mendapatkan optimasi pemotongan dengan enzim restriksi.

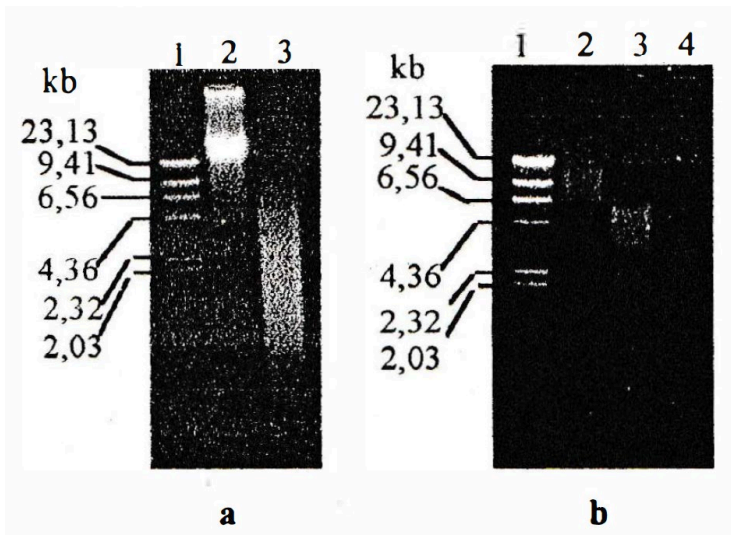
Selanjutnya dilakukan pemotongan DNA kromosom skala besar. Hasil pemotongan parsial DNA kromosom dapat dilihat pada gambar 4.3.



Gambar 4.3. Elektroforesis hasil pemotongan parsial DNA kromosom. Pada lajur : (1) DNA λ dipotong dengan enzim *Hind*III sebagai standar ukuran DNA. (2) DNA kromosom *uncut*. (3,4,5,6,7) berturut-turut DNA kromosom dipotong dengan enzim *Sau*3AI dengan aktivitas 0,25 unit, 0,5 unit, 0,75 unit, 1,00 unit, dan 1,25 unit.

Optimasi pemotongan parsial DNA kromosom *S. typhimurium* oleh enzim *Sau3AI* pada penelitian ini diperoleh kondisi waktu inkubasi 30 menit dengan aktivitas enzim *Sau3AI* 0,5 unit/ μ g DNA kromosom. Hasil pemotongan DNA kromosom dengan enzim restriksi *Sau3AI* dielektroforesis pada gel agarosa dengan DNA λ /HindIII digunakan sebagai standar ukuran DNA. Fragmen DNA yang berukuran 4-5 kb pada gel agarosa dipotong dan selanjutnya dimurnikan, hasilnya dapat dilihat pada gambar 4. 4.

Penggunaan enzim restriksi *Sau3AI* pada pembuatan koleksi genom karena Enzim *Sau3AI* memiliki 4 basa sisi pengenal, sehingga enzim tersebut dapat mengenali satu kali setiap 256 nukleotida. Oleh karena itu enzim *Sau3AI* dapat mengenali lebih banyak sisi pemotongan pada DNA kromosom dibandingkan dengan enzim restriksi yang memiliki lebih dari 4 basa sisi pengenal.



Gambar 4.4. Elektroforesis basil pemotongan parsial skala besar, dan pemurnian fragmen DNA pada gel agarosa. Pada gambar 4.4.a. hasil pemotongan parsial skala besar. Pada gambar 4.4.b. hasil pemurnian fragmen DNA dari gel agarosa. Pada lajur: (1) DNA λ dipotong *Hind*III sebagai standar ukuran DNA. (2) fragmen DNA kromosom ukuran lebih dari 6kb. (3) fragmen DNA kromosom ukuran 4-6 kb, (4) fragmen DNA kromosom ukuran kurang dari 4kb.

Jumlah sisi pengenalan yang banyak pada enzim restriksi tersebut, memungkinkan DNA kromosom akan terfragmentasi lebih banyak. Untuk mendapatkan DNA sisipan yang sesuai dengan

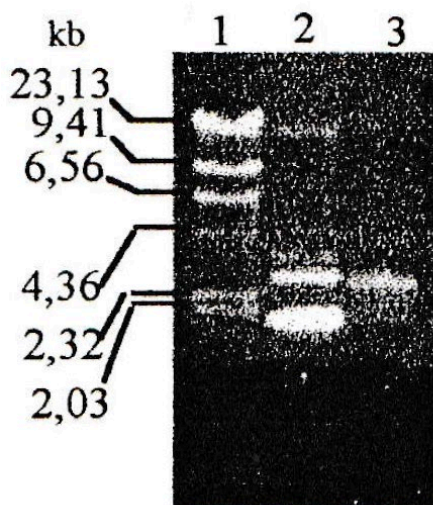
kebutuhan maka pemotongan enzim restriksi tersebut diatur dengan variasi waktu inkubasi dan variasi konsentrasi enzim restriksi.

Pada gambar 4.4.b adalah basil pemurnian dengan menggunakan metode USB BioC/ean menghasilkan randemen sebesar 80%,. Pada lajur 3 adalah fragmen DNA ukuran kurang lebih 4-5 kb yang digunakan sebagai DNA sisipan.

c. DNA Vektor

Penyediaan DNA vektor pUC19 dilakukan dengan cara pemotongan dengan enzim restriksi *Bam*HI. Hasil pemotongan dengan enzim tersebut menghasilkan 1 pita dengan ukuran kurang lebih 2,69 kb. Pemotongan DNA vektor pUC 19 dengan enzim restriksi *Bam*HI menghasilkan sisi pemotongan yang komplemen dengan sisi pemotongan enzim *Sau*BI. DNA sisipan yang diligasi dengan vektor tersebut adalah basil pemotongan parsial enzim

*Sau3A*I. Selanjutnya vektor yang telah dipotong dengan enzim restriksi *Bam*HI didefosforilasi. Tujuan defosforilasi vektor adalah untuk menghindari ligasi dengan dirinya sendiri (self ligation). Hasil dapat dilihat pada gambar 4. 5.



Gambar 4.5. Elektroforesis basil pemotongan DNA pUC19. (1) DNA λ dipotong dengan enzim *Hind*III sebagai standar ukuran DNA. (2) pUC *uncut*, dan (3) pUC 19 dipotong dengan enzim *Bam*HI.

d. Transformasi

Setelah dilakukan ligasi selanjutnya dilakukan transformasi sel inang *E. coli* JM109 dengan cara memasukkan DNA rekombinan ke dalam sel inang. Hasil transformasi ditumbuhkan pada media LB yang mengandung antibiotik ampisilin, IPTG dan X-gal. Hasil transformasi menunjukkan adanya 10 koloni biru dan 81 koloni tidak berwarna.

3. Seleksi koleksi genom

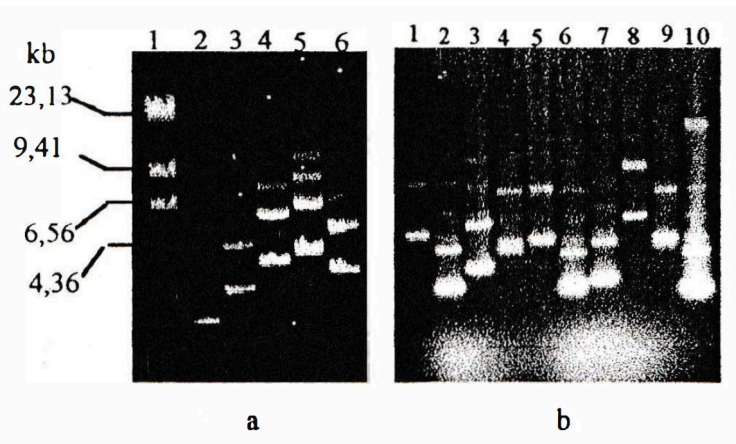
Seleksi plasmid rekombinan terhadap plasmid bukan rekombinan dilakukan atas dasar sifat fenotifiknya yaitu adanya koloni yang berwarna biru dan koloni yang tidak berwarna. Koloni bukan rekombinan akan tumbuh dan berwarna biru, hal ini disebabkan plasmid pUC 19 memiliki gen resisten antibiotik ampisilin, dan gen *lacZ* yang mengode enzim β *gaktosidase* yang berfungsi memecahkan laktosa menjadi glukosa dan galaktosa. Pada

penelitian ini menggunakan analog laktosa yaitu Xgal (5-bromo-4-kloro-3-indolil-13-Dgalaktopiranosid).

Pada koloni bukan rekombinan gen *LacZ* masih utuh, sehingga mampu mensintesis enzim *β galaktosidase* untuk menguraikan X-gal, dengan adanya inducer IPTG produk pemecahan enzim tersebut berwarna biru. Koloni rekombinan tidak berwarna, hal ini disebabkan gen *lacZ* telah disisipi fragmen DNA, dengan demikian gen ini rusak sehingga tidak mampu mensintesis enzim *β galactosidase*. Hasil seleksi terhadap koloni yang tumbuh diperoleh 81 koloni rekombinan.

4. Hasil isolasi DNA plasmid rekombinan

Proses selanjutnya, plasmid rekombinan yang diperoleh diisolasi untuk menentukan adanya fragmen DNA sisipan dalam vektor pUC19. Hasil isolasi plasmid DNA rekombinan dapat dilihat pada gambar 4.6.



Gambar 4.6. Elektroforesis basil isolasi DNA rekombinan pada gel agarosa. Pada gambar 4.6.a lajur: (1) DNA λ /*Hind*III, sebagai standar ukuran DNA (2) pUC19 *uncut*, (3) sampai dengan (6) berturut-turut adalah DNA koloni no. 2, 5, 80, 81. Pada gambar 4.6.b lajur: (1) sampai (9) berturut-turut adalah hasil isolasi DNA koloni no. 24, 29, 68, 75, 76, 77, 78, 80, dan 81. Pada lajur 10 adalah DNA pUC19 *uncut*.

Hasil elektroforesis isolasi DNA rekombinan pada gambar 4.6 menunjukkan adanya pola pita yang berbeda dengan pola pita pUC 19 *uncut*. Molekul DNA rekombinan pada proses elektroforesis gel agarosa bermigrasi lebih lambat dibandingkan

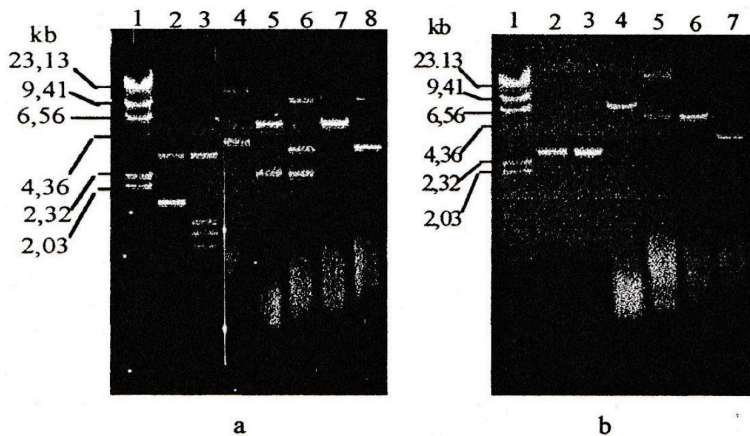
dengan molekul DNA pUC19 *uncut*. Hal ini disebabkan ukuran molekul DNA rekombinan lebih besar daripada molekul DNA pUC19 *uncut*. Dengan demikian pola pita DNA rekombinan pada gel agarosa nampak di atas pola pita pUC19 *uncut*. Selanjutnya DNA rekombinan ini akan dianalisis dengan enzim restriksi.

a. Analisis restriksi

Analisis restriksi plasmid DNA rekombinan dilakukan dengan tujuan untuk menentukan adanya fragmen DNA sisipan. Pemotongan dengan satu enzim restriksi untuk menentukan panjang fragmen DNA sisipan yang terligasi pada DNA vektor pUC19. Sedangkan pemotongan dengan dua enzim restriksi dengan tujuan untuk mengeluarkan fragmen DNA sisipan dan DNA vektor pUC19.

Hasil pemotongan dengan menggunakan satu enzim restriksi menunjukkan ukuran fragmen DNA

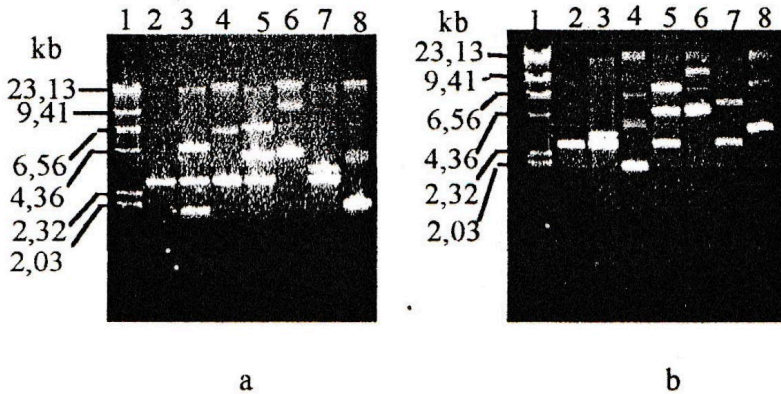
rekombinan lebih besar dari 2,69 kb. Ukuran fragmen DNA pUC 19 adalah 2,69 kb, hal ini menunjukkan adanya fragmen DNA sisipan yang dibawa oleh vektor pUC 19. Hasil pemotongan DNA plasmid rekombinan dengan menggunakan satu enzim restriksi dan dengan menggunakan dua enzim restriksi dapat dilihat pada gambar 4. 7 dan gambar 4.8.



Gambar 4.7. Elektroforesis basil pemotongan DNA rekombinan dengan satu enzim restriksi. Pada gambar 4. 7.a lajur : (1) DNA λ / *Hind*III sebagai ukuran DNA standar. (2) DNA pUC19 *uncut*. (3, 5, 7) fragmen DNA koloni nomor 29, 75, dan 76 dipotong

enzim restriksi *EcoRI*, sedangkan (4, 6, 8) fragmen DNA koloni nomor 29, 75, dan 76 *uncut*. Pada gambar 4.7.b lajur: (1) DNA λ /*HindIII* sebagai standar ukuran DNA. (2) DNA pUC19/*EcoRI*, (3) DNA pUC19/*BamHI*, (4,6) fragmen DNA koloni 80 dan 81 dipotong enzim restriksi *EcoRI*, sedangkan (5,7) koloni 80 dan 81 *uncut*.

Pada gambar 4.7.a lajur 3 menunjukkan ukuran fragmen DNA rekombinan kurang lebih 7 kb. Pada lajur 5 dan lajur 7 ukuran fragmen DNA rekombinan kurang lebih 6,5 kb. Hal ini menunjukkan adanya DNA sisipan pada vektor pUC19. Untuk membuktikan fragmen DNA sisipan yang melakukan ligasi dengan vektor pUC19 dilakukan pemotongan sempurna dengan dua enzim restriksi. Hasil pemotongan dengan dua enzim restriksi dapat dilihat pada gambar 4.8.



Gambar 4.8 Analisis restriksi DNA rekombinan. Pada gambar 4.8.a lajur: (1) DNA λ /*Hind*III, (2) DNA pUC/*Bam*HI, lajur (3, 5, dan 7) fragmen DNA koloni nomor 2, 5, dan 24 dipotong dengan enzim *Kpn*I dan *Xba*I, lajur: (4, 6, dan 8) adalah fragmen DNA koloni nomor 2, 5, 24 *uncut*. Pada gambar 4.8.b lajur: (1) DNA λ /*Hind*III, (2) DNA pUC19/*Bam*HI, lajur (3, 5, dan 7) fragmen DNA koloni nomor 78, 80, dan 81 dipotong dengan enzim *Kpn*I dan *Xba*I sedangkan lajur (4, 6 dan 8) adalah fragmen DNA koloni nomor 78, 80 dan 81 *uncut*.

Pada gambar 4.8 menunjukkan pemotongan dengan menggunakan dua enzim restriksi menghasilkan fragmen DNA dengan ukuran 2,69 kb dan fragmen DNA lain. Pita fragmen DNA ukuran 2,69 kb merupakan DNA vektor pUC19, hal ini

membuktikan bahwa DNA sisipan melakukan ligasi pada vektor pUC19. Fragmen DNA selain ukuran 2,69 kb merupakan fragmen DNA sisipan (DNA *S. typhimurium*) yang dibawa oleh vektor tersebut. Pada gambar 4.8.a lajur 3 hasil pemotongan dengan 2 enzim restriksi menghasilkan 3 pita dengan jumlah total ukuran DNA sisipan kurang lebih 6,3 kb, sedangkan ukuran DNA sisipan yang dipergunakan pada penelitian ini ukurannya kurang lebih 4-5 kb. Hal ini disebabkan karena kedua enzim restriksi tersebut belum memotong sempurna DNA rekombinan, sehingga ada molekul DNA rekombinan yang baru terpotong dengan satu enzim restriksi. Hal ini juga dapat menjelaskan pada molekul DNA rekombinan yang lain. Ukuran DNA sisipan pada lajur 2, 5, dan 7 pada gambar 4.8.a tersebut masing-masing kurang lebih 4,3 kb, 5 kb, dan 4 kb. Hasil analisis restriksi menunjukkan ukuran DNA sisipan yang dibawa oleh vektor rata-rata 4-5 kb.

b. Sekuensing

Pada Bab I Pendahuluan telah dikemukakan bahwa penelitian ini dilakukan dengan pendekatan koleksi parsial genom *S. typhimurium*. Oleh karena itu dilakukan penentuan urutan nukleotida beberapa klon dari koleksi parsial genom tersebut. Sekuensing dilakukan dengan menggunakan primer universal (univ.) dan primer reverse M13 (rev.). Plasmid rekombinan yang disekuensing pada penelitian ini adalah plasmid rekombinan koleksi parsial genom nomor: 2, 5, 80, dan 81. Urutan nukleotida yang diperoleh selanjutnya dilakukan analisis homologi dengan data pada *GeneBank*. Hasil sekuensing secara keseluruhan yang berupa jumlah basa yang dihasilkan dapat dilihat pada tabel 4.1. Salah satu contoh basil sekuensing klon nomor 2 dengan menggunakan primer universal dapat dilihat pada gambar 4.9. Selanjutnya basil sekuensing secara lengkap dapat dilihat pada lampiran 1. Pada tabel 4. 1 menunjukkan jumlah basa yang dihasilkan pada

reaksi sekuensing dengan menggunakan dua primer rata-rata kurang lebih 700 pb. Hasil reaksi sekuensing ini selanjutnya akan dilakukan analisis homologi dengan data yang ada pada *GenBank*.

Tabet 4.1. Data hasil sekuensing

Nomor klon	DNA sisipan	Primer sekuensing		Σ basa yang Dihasilkan
		univ.	revers.	
2	4,3 kb	396 pb	388 pb	784 pb
5	3,5 kb	335 pb	385 pb	720 pb
80	4,3 kb	327 pb	374 pb	701 pb
81	5 kb	363 pb	434 pb	797 pb

c. Analisis homologi

Urutan nukleotida yang diperoleh selanjutnya dilakukan analisis homologi dengan bantuan Internet melalui program *Blast* dengan data yang ada pada *GenBank*. Setelah dilakukan analisis homologi urutan nukleotida, akan dilakukan analisis homologi urutan asam amino.

1) Analisis homologi DNA

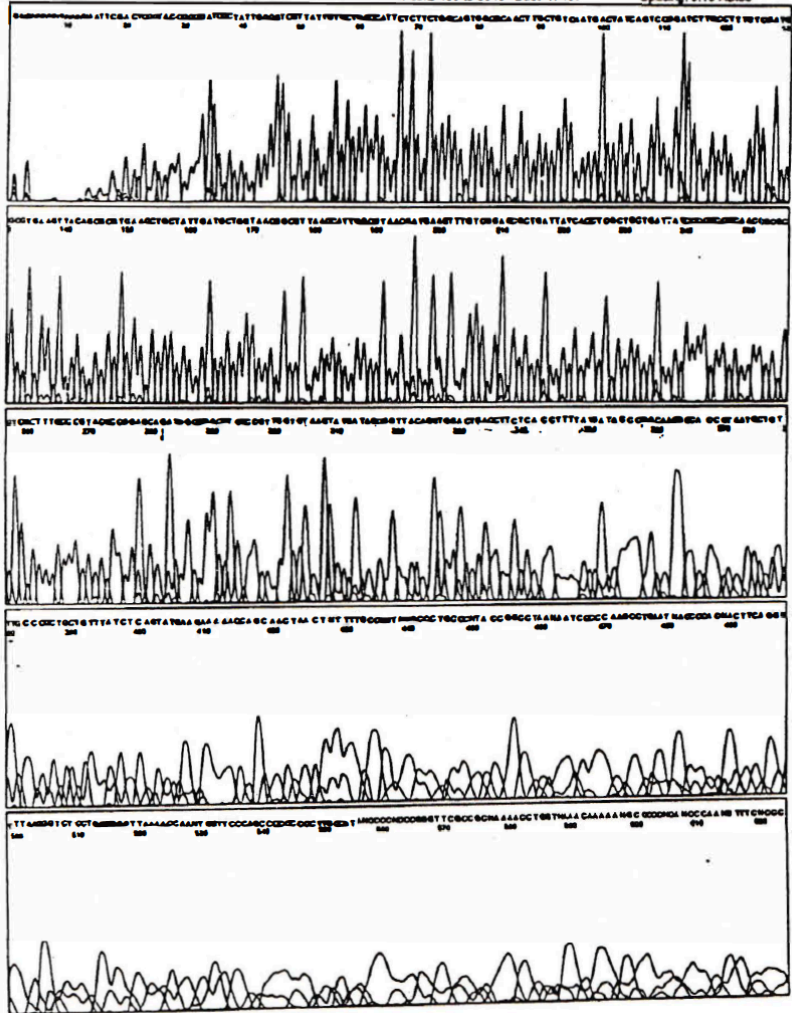
Seperti yang telah dikemukakan pada bab III, urutan nukleotida yang diperoleh kemudian dilakukan *scanning* dan dimasukkan ke program *word*. Melalui program *word* urutan nukleotida selanjutnya di submit ke *Blast Sequence Similarity* pada *GenBank*. Hasil analisis homologi urutan nukleotida fragmen DNA *S. typhimurium* dengan data yang ada pada *GenBank* dapat dilihat pada tabel 4.2. Salah satu contoh hasil analisis homologi urutan nukleotida klon nomor 2 dapat dilihat pada gambar 4.10. Hasil analisis homologi urutan nukleotida secara lengkap dapat dilihat pada lampiran 2.

Hasil yang diperoleh dari analisis homologi ke-4 klon rekombinan, menunjukkan bahwa urutan nukleotida klon nomor 2 dianalisis dalam jumlah yang cukup banyak dan mempunyai homologi yang tinggi. Selanjutnya akan dibahas analisis homologi tingkat

DNA dan asam amino dari urutan nukleotida klon nomor 2.

Hasil analisis urutan nukleotida koleksi genom nomor 2 ternyata mempunyai homologi dengan gen *ruvB* pada *E. coli* K-12. Hasil analisis dapat dilihat pada gambar 4.10. Analisis homologi urutan nukleotida koleksi genom nomor 2 *S. typhimurium* dimulai dari urutan basa ke-1 sampai urutan basa ke-396 dengan data yang ada pada *GenBank* di mulai dari urutan basa ke-2223 sampai urutan basa ke-2618. Hasil analisis ini menunjukkan bahwa urutan nukleotida koleksi genom nomor 2 mempunyai homologi dengan urutan nukleotida *E. coli* K-12 MG 1655 section 170 of 400 *complete genome*. Urutan nukleotida antara 2223 sampai 2618 pada *E. coli* K-12 MG1655 merupakan urutan nukleotida gen *ruvB*. Urutan nukleotida *E. coli* K-12 MGI655 dapat dilihat sebagian pada gambar 4. 11.

Hasil analisis homologi 396 pb urutan DNA *S. typhimurium* pada *GenBank* memiliki homologi sebesar 79 %, dengan gen *ruvB*, ada 82 pb yang tidak homologi diantaranya 52 pb mengalami perubahan transisi dan 30 pb mengalami perubahan transversi.



Gambar 4.9 Unrutan nukleotida koleksi Genom nomor 2 *S.typhimurium* universal primer.

Tabel 4. 2. Analisis homologi sebagian urutan DNA *S. typhimurium* koloni nomor: 2, 5, 80, 81 pada *GenBank*.

No. klon	Primer sekuen sing	ΣDNA sekuen sing	Persen homolog	Nama gen pada <i>GenBank</i> yang mempunyai homologi	Organisme
2	univ.	396	84	struktur and regulation of the <i>E. coli</i> <i>ruv</i> operon involved in DNA repair and recombination	<i>E. coli</i>
			79	<i>E. coli</i> K12 MG1655 section 170 of 400 of the complete genome.	<i>E. coli</i>
			84	The complete genome sequence of <i>E. coli</i> -K-12	<i>E. coli</i>
			84	A 460-kb DNA sequence of the <i>E. coli</i> K-12 genome corresponding to 41,6-41,9 min region on the linkage map	<i>E. coli</i>
			84	A 460-kb DNA sequence of the <i>E. coli</i> K-12 genome corresponding to 41,9-42,3 min region on the linkage map	<i>E. coli</i>
2	revers	388	-	-	-
5	univ.	335	-	-	-
5	revers	385	87	<i>E. coli</i> arabinose-proton symporter (<i>araE</i>) gene, complete cds, and <i>lysA</i> activator protein (<i>lysR</i>) gene, 3'end	<i>E. coli</i>
			86	<i>E. coli</i> -K-12 complete genome	<i>E. coli</i>
			85	<i>K. oxytoca</i> <i>ara</i> gene	-
80	univ.	327	100	<i>S. typhimurium</i> DNA insertion sequence IS200 in virulen plasmid pSLT	<i>S. typhimurium</i>
			100	<i>S. typhimurium</i> putative IS200 transposase gene, complete cds.	<i>S. typhimurium</i>
			100	IS1351 A new insertion element, interrupts an IS200 copy conserved among clinically important serogroup D1 <i>Salmonellae</i>	<i>S. enteridis</i>
			100	STIFLLA <i>S. typhimurium</i> sigma faktor (<i>fliA</i>) gene	<i>S. typhimurium</i>
			100	<i>S. typhimurium</i> IS200 transposase (<i>tnpA</i>) gene complete cds.	<i>S. typhimurium</i>
			100	<i>S. typhimurium</i> IS200 insertion sequence from SARA17	<i>S. typhimurium</i>
			99	<i>S. typhi</i> gene encoding putative IS200	<i>S. typhi</i>
			99	<i>S. typhi</i> <i>flgL</i> gene, gene encoding putative IS200 transposase	<i>S. typhi</i>
			98	<i>S. abortusosis</i> DNA for insertion element IS200	<i>S. abortusosis</i>

2041	gctcggatg	gctggagaag	cgccacagc	tgccgatcga	cacgttatta	gggattatg
2101	cgcacagtgc	cctgtcgtg	ggcctggtg	tcgtgagtct	gatgtcta	attcgtgtg
2161	atthgatg	ttacctgttc	ggtgatttc	tgccagtgc	gccagaagat	ctcatctca
	Daerah homologi yang dianalisis					
2221	ttgcgattg	ctggtgcatc	gtgggtgcta	ttttgttctg	gcaatggcgc	aatttgctgt
2281	caatgacgat	aagcccgat	ctggcgtttg	ttgatggtgt	gaaattacag	cgagtgaat
2341	tgttgtgat	gctggtgacg	gcattgacga	ttggtgtagc	gatgaaattt	gtcgggtcgt
2401	tgattattac	ttcgttctg	attattcctg	ctgctactgc	gcgtcgtttt	gcccgcacgc
2461	cggaacagat	ggctggtgtc	gctgttttgg	tggggatggt	ggcagtgact	ggcggtttaa
2521	ctttttccgc	ggttaacgat	acgccggcgg	gtccgtcggg	ggtgctatgt	gcggcactgt
2581	tattttattct	cagtatgatg	aaaaagcagg	ccagctaatac	tatcgtgtaa	cacattgtc
2641	ggatgcggcg	cgagcgcctt	atccgaccta	cggttcggta	tctctggtag	tcttgtaag
2701	acgcgaacag	cgctgcatca	ggcatattgc	cagtgccgga	tgccgcccga	gcgaccaatc
2761	cgacttacgg	catttctggc	ggcgttatgc	caaagtgatt	ccacgccccg	gtcgtcgcca
2821	tacgccacg	cggtgtacgc	tgcaaaaagc	cttgcgtaat	caaataaggt	tccagcacat
2881	ctcaatggt	ttcacgttct	tcgccaatgg	ctgccgccag	ggtatccaga	ctcacaggtc
2941	caccaagaa	cttatcgatt	accgccagca	acaatttggc	gtccataata	tcgaaacctt
3001	cagcatcgac	attcaacata	tccagcgcct	gagcagcgat	atctgccgag	atggtgccat

Gambar 4.11 Urutan nukleotida Sebagian *E. coli* K-12 MG1655 *complete genom*.

2) Analisis homologi asam amino

Proses selanjutnya dengan bantuan program *Genmon* urutan nukleotida *S. typhimurium* klon nomor 2 diterjemahkan ke dalam asam amino. Urutan asam amino ini kemudian dipindahkan ke program *word*. Melalui program *word* urutan asam amino dikirim ke *Blastp sequence similarity* pada *GenBank*. Hasil analisis homologi urutan asam amino koleksi genom nomor 2, dan 80 *S. typhimurium* dengan data yang ada pada *GenBank* dapat dilihat pada tabel 4.3. Hasil analisis homologi urutan asam

amino koleksi genom nomor 2 *S typhimurium* dengan gen *ruvB* dapat dilihat pada gambar 4.12.

Hasil analisis homologi urutan asam amino koleksi genom nomor 2 menunjukkan homologi sebesar 93% dengan gen *ruvB* pada *E. coli* K-12. Gen *ruvB* pada *E. coli* panjangnya 261 asam amino, start kodon gen *ruvB* dimulai pada basa ke-1833 dan stop kodonnya pada basa ke-2618 pada *E. coli* K-12 MG1655 section 170 of 400 (dapat dilihat pada gambar 4.11). Analisis homologi urutan asam amino *S. typhimurium* koleksi genom nomor 2 dengan gen *ruvB* dimulai pada urutan asam amino ke-130 sampai urutan asam amino ke-261 pada gen *ruvB* atau sampai ke stop kodon gen *ruvB*. Sejumlah 131 asam amino koleksi genom nomor 2 *S. typhimurium* yang dianalisis tingkat homologinya dengan gen *ruvB*, terdapat 3 asam amino yang berbeda positif, yaitu perbedaan terjadi hanya dalam 1 kelompok asam amino. Urutan asam amino yang berbeda tersebut yaitu pada urutan ke-138, asam amino V pada gen

ruvB menjadi asam amino L pada fragmen DNA *S. typhimurium*, kemudian pada urutan ke-233 asam amino I pada gen *ruvB* menjadi asam amino V pada fragmen DNA *S. typhimurium* dan pada urutan ke-244 asam amino V pada gen *ruvB* menjadi asam amino M pada fragmen DNA *S. typhimurium*. Gen *ruvB* lengkap pada *E.coli* K-12 MG1655 dapat dilihat pada gambar 4.13.

Berdasarkan hasil analisis homologi tingkat DNA dan asam amino koleksi genom *S. typhimurium* nomor 2, terhadap gen *ruvB* *E.coli* K-12 menunjukkan homologi yang tinggi, yaitu 79% pada tingkat DNA dan 93% pada tingkat asam amino. Selanjutnya dengan bantuan program Protolize menunjukkan prediksi struktur sekunder asam amino *S. typhimurium* sama dengan struktur sekunder gen *ruvB* pada *E. coli* K-12. Perbedaan asam amino yang ada diantara kedua gen tersebut tidak terjadi pada satu daerah, sehingga konformasi kedua struktur sekunder tidak mengalami perubahan. Hasil analisis

ini diduga *S. typhimurium* memiliki gen *ruvB*. Seperti yang telah dijelaskan pada Bab II bahwa produk gen *ruv* dibutuhkan untuk rekombinasi genetik dan rekombinasi perbaikan kerusakan DNA. Gen yang diperoleh dalam penelitian ini baru sebagian, yaitu bagian hilir gen tersebut.

Tabel 4.3 Analisis homologi asam amino.

Nomor koloni	primer sekuensing	pembacaan	Σasam amino yang dianalisis	persen homologi	Nama Gen yang memiliki homologi pada <i>GenBank</i>	Kode akses
2	univ.	urutan sekuensing	131	87	Hypothetical 27,8 KD protein in MSBB- <i>RUVB</i> intergenic region (<i>E. coli</i>)	P39832
2	univ.	urutan sekuensing	103	98	Hypothetical protein HI 0407 (<i>E. coli</i>)	P44691
2	revers	komplemen	126	90	Hypothetical 30,2 KD protein in MODC-BIO A intergenic region (<i>E. coli</i>)	P21829
80	univ.	urutan sekuensing	45	100	Insertion sequence IS200 from <i>Escherichia coli</i>	I41311
			45	100	Insertion sequence IS200 from ECOR 63- <i>Escherichia coli</i>	I41312

```

#####
!      GENKON version 4.1 - Module: compare - Date: Sun 5-Apr-98 16:15      !
#####

Scanning entire sequence for 90% homology

Linear Protein sequence RUVSTM(1:131)
Homology 122/131 = 93%
Linear Protein sequence RUVIGB(131:261)

AIGVVIIVLAILFWQWRNLLSMTISPDLAFVDBGVKLQRVKLLMLVTALTIGVTKMFKVGGAL IITSLIIPAATARRFARTP
#####
AIGVVIIVVAILFWQWRNLLSMTISPDLAFVDBGVKLQRVKLLMLVTALTIGVAMKFKVGGAL IITSLIIPAATARRFARTP

EQMAGVAVGVSMIAVTGGLTFSAFYDTPAGPSVVLCAALLFIFSMKKQAS
#####
EQMAGVAVLVGMVAVTGGLTFSAVYDTPAGPSVVLCAALLFILSMKKQAS

```

Gambar 4.12 Analisis homologi urutan asam amino koleksi Genom *S. typhimurium* nomor 2 pada *GeneBank*.

```

MIELLFPGWLAGIMLACAAGPLGSFVWRRMSYFGDTLAHASLL
GVAFGLLLDVNPFFYAVIAVTLLLAGGLVWLEKRPQLAIDTLLGIMAHSAALSGLVVVS
Daerah homologi yang dianalisis
LMSNIRVDLMAYLFGDLLAVTPEDLISIAIGVVIIVVAILFWQWRNLLSMTISPDLAFV
DGVKLRVKLLMLVTALTIGVAMKFKVGGAL IITSLIIPAATARRFARTPEQMAGVAV
LVGMVAVTGGLTFSAVYDTPAGPSVVLCAALLFILSMKKQAS" ;

```

Gambar 4.13 Gen *ruvB* lengkap *E. coli* K-12 MG1655.

BAB V PENUTUP

Penelitian ini bertujuan untuk memperoleh sebagian informasi genetik dari koleksi parsial genom *S. typhimurium*. Untuk mencapai tujuan tersebut dilakukan penentuan urutan nukleotida beberapa klon dari koleksi parsial genom *S. typhimurium*.

Hasil isolasi DNA kromosom *S. typhimurium* yang digunakan pada pembuatan koleksi genom diperoleh dengan konsentrasi 510 ng/ μ l dan kemudian 1, 7: DNA kromosom tersebut dipotong dengan enzim restriksi *Sau*3AI, pada kondisi aktivitas enzim *Sau*3AI 0,5 unit/ μ g DNA kromosom, waktu inkubasi 30 menit pada suhu 37 °C. DNA kromosom hasil pemotongan ini digunakan untuk ligasi dengan vektor pUC19, selanjutnya dilakukan transformasi. Koloni yang tumbuh dari hasil transformasi diseleksi berdasarkan sifat fenotifiknya yaitu koloni yang berwarna biru dan koloni yang tidak berwarna. Hasil seleksi diperoleh 81 koloni rekombinan.

Hasil analisis restriksi DNA rekombinan menunjukkan adanya DNA sisipan pada vektor pUC19. Hal ini dibuktikan dengan cara DNA rekombinan dipotong dengan dua enzim restriksi menghasilkan fragmen DNA yang berukuran 2,69 kb, dan fragmen DNA lain. Fragmen DNA yang berukuran 2,69 kb merupakan fragmen DNA pUC19. Fragmen DNA selain ukuran 2,69 kb merupakan fragmen DNA *S. typhimurium*. Ukuran fragmen DNA sisipan yang dibawa oleh vektor pUC 19 rata-rata 4-5 kb.

Penentuan urutan nukleotida koleksi genom *S. typhimurium* nomor 2, 5, 80, dan 81 dengan menggunakan satu primer diperoleh masing-masing kurang lebih 350-400 pb. Urutan nukleotida tersebut telah dianalisis homologinya dengan data yang ada pada *GeneBank*.

Hasil analisis homologi urutan nukleotida dan urutan asam amino koleksi genom *S. typhimurium* nomor 2 menunjukkan adanya homologi dengan gen *ruvB* *E. coli* K-12. Dengan bantuan program *protolyze* menunjukkan struktur sekunder kedua gen tersebut adalah sama. Atas dasar hasil analisis ini diduga bahwa pada *S. typhimurium* memiliki gen *ruvB*. Gen yang diperoleh pada penelitian ini baru sebagian yaitu pada bagian hilir gen tersebut. Untuk penelitian selanjutnya diharapkan mendapatkan gen *ruvB* bagian hulu, sehingga dapat melengkapi gen *ruvB* bakteri *S. typhimurium*.

DAFTAR PUSTAKA

Adam, A.R.D., and Maegraith, B.G., Clinical Tropical Disease, 4th ed. Blackwell Scientific Publication, Oxford, 1977, p. 455.

Barinaga, M., New technique offer a window on Bacteria's secret Weapons, Science vol: 259, 1992, p. 595.

Briles, D.E., Dunlap, N.E., Swords, E., Early events in the pathogenesis of enteric fever in mice, Plenum Press, New York and London, 1992, p. 159-167.

Boulnois, G.J., Gene cloning and analysis, Blackwell scientific Publications, 1987, p. 63.

Boehringer Mannheim, Biochemica, Application Manual, Germany, 1989, pp. 1-3.

Brown, T.A., Genetics a molecular approach, Chapman & Hall, London, 1989.

Cabello, F., Hormaeche, C., Mastroeni, P., Bonina, L., Biology of *Salmonella*, Plenum Press, New York and London, 1992.

Dorman, C.J., Nibhriain, N., Coordination of gene expression in pathogenic *Salmonella typhimurium*, Plenum Press, New York and London, 1992, p. 51-63.

Ernest , J., Mikrobiologi untuk Propesi Kesehatan, Yayasan EGC, Penerbit buku kesehatan, Jakarta, 1984.

Hishida, T., Iwasaki, H., Ishioka, K., Shinagawa, H., Molecular analysis of pseudomona'> aeruginosa genes, *ruvA*, *n1vB* and *ruvC*, involved in processing of homologous recombination intermediates, *Gene*, 1996.

Jawetz, E., Melnick, J.L., Aderberg, E.A., Review of medical Microbiology. Dalam Gerard Bonang, dr.(eds): Mikrobiologi untuk profesi kesehatan,

Yayasan E.G.C., Penerbit Buku Kesehatan, Jakarta, 1984, pp. 181-190, 288-301.

Innis, M.A., and Gelfand, H., Optimization of PCR : PCR protokoi. A Guide to method and applications, Academic Press, Inc., California, 1990, pp. 3-12.

- Jiang, X.M., Neal, B.F., Santiago, S.J., Lee, L.K., Romana and Reeves, P.R., Struktur and Sequence of the rfb (o antigen), Gen Cluster of *Salmonella Serovar Typhimurium* (Strain L T2), *Mol. Microbiol* 5, 1991, p. 659-713.
- Linliu, S., Wong, K.K., McClelland, M., Sanderson, K.E., Contruktion of physical map of the genome of *Salmonella typhimurium*, Plenum Press, New York and London, 1992.p. 41-50.
- Mahan, M.J., Slanch, J.M. and Mekalanos, J.J., Selection of Bacterial Vtrulence genes that Are Specifically Induced in host tissues, *Science* 259, 1993, pp. 686-688.
- Mandal, T.N., Mahdi, A.A., Sharples, G.J., Lloyd, R.G., Resolution of holliday intermediates in recombination and DNA repair: indirect suppression of ruvA, ruvB, and ruvC mutations, *J. Bacteriol*, 1993.
- Mahdi, A.A, Sharples, GJ., Manda!, T.N., Lloyd, R.G., Holliday junction resolvases encoded by homologous rusA genes in *Escherichia coli* K-12 and phage 82, *J. Mol. Biol*, 1996

Muktiningsih, Noer, AS. , Wirahadikusumah, M., Analisis Homologi Beberapa Fragmen DNA Gen Carbomyl phosphate :,ynthethase Hasil Amplifikasi dengan Teknik PCR, Proseding Seminar Kimia bersama ITB-UKM kedua, 1995.

Murray, E.J., Gen Transfer and Expression Protocols, Humana Press, New Jersey, 1984.

Newton, C.R., Graham, A., PCR, β Ios Scientific publishers, 1994.

Nagel, R., Chan, A, Rosen, A, Ruv and *recG* genes and the induced precise excision of Tn 10 in *Escherichia coli*, Mutat. Res, 1994.

Paul, B. , Textbook of Medicine, W.B. Saunders company, London, 1974.

Noer, A.S., Martasih, F., Mulyani, S., Muktiningsih, Wirahadikusumah, M., Analisis Variasi Urutan Nukleotida D-loop MtDNA Manusia Dari Beberapa daerah di Indonesia, Proseding Seminar Kimia bersama UKM-ITB Pertama, Bandung, 1994, pp. 201-214.

Pharmacia LKB Biotechnology, ^{T7} Sequencing TM Kit, Pharmacia P-L Biochemicals, Inc., 1990.

- Parsons, C.A., Tsaneva, I., Lloyd, R.G., West, S.C., Interaction of *Escherichia coli* RuvA and RuvB proteins with synthetic hollyday junction, Proc. Natl. Acad Sci. USA, 1992.
- Perbal, B., A Practical Guide to Molecular Cloning, John Wiley & Sons, New York, 1984.
- Perry, M.B., Some struktural aspects of the antigenic o-polysaccharide components of *Salmonella* somatic lipopolysaccharides, Plenum Press, New York and London, 1992.
- Perkin Elmer, Comparative PCR Sequencing, The Perkin-Elmer corporation, 1995.
- Promega, The source for discovery, Promega Corporation, 1996 Robbins, S.L., Pathologic Basis of Disease, W.B. Saunders company, London, 1974.
- Robert, R.J., Restriction Enzymes : Molekular Genetic Analysis of Population a Pratical Approach, Oxford University Press, Inc., new york, 1944, pp3-17.
- Sambrook, J., Fritsh, E.F., and Maniatis, T., Molecular Cloning a Laboratory Manual, second edition, vol. 1-2-3, Cold Spring Harbor Laboratory Presss, USA, 1989.

Satta, G., Ingianni, A., Muscas, P., Rossolini, G.M., Pompei, R., The pathogenic determinants of *Salmonella typhi* : Potential role of fimbrial structures, Plenum Press, New York and London, 1992.

Shiba, T., Iwasaki, H., Nakata, A., shigawa, H., facherichia coli *RuvA* and *RuvB* protein involved in recombination repair: physical properties and interaction with DNA, Mo!. Gen. Genet, 1993.

Tsanewa, IR, Muller, B., West, S.C., *RuvA* and *RuvB* protein of *Escherichia coli* exhibit DNA helicase activity in vitro, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1993.

Usera, M.A., *Salmonella typhi* in Spain: Epidemiological markers and antirnikrobial susceptibility, Plenum Press, New York and London, 1992, p. 15-25.

United states biochemical , 74200 *USBioclean*™ KIT, 1993.

Watson, J.D., Tooze, J., Kurz, D.T., Recombinant DNA, Cold Spiring Harbor Laboratory press, USA, 1983, pp. 62-64.

Widodo, D., Nelwan, R.H., Soemarsono, Treatment of tyfoid fever with "Unasyn" Simposium Perkembangan Baro Dalam Penanggulangan Resistensi bakteri, Jakarta, 1989.

Winnacker, E.L., From gene to clones, VCH verlagsgesellschaft mbH, 1987, p. 383-395.

West, S.C., Connolly, B., Biological roles of the *Escherichia coli* RuvA, RuvB, and RuvC proteins revealed, *Mol. Microbiol*, 1992.

Lampiran I Hasil sekvensing beberapa klon koleksi genom *S. Opheiosaurus*
 Primer : Universal

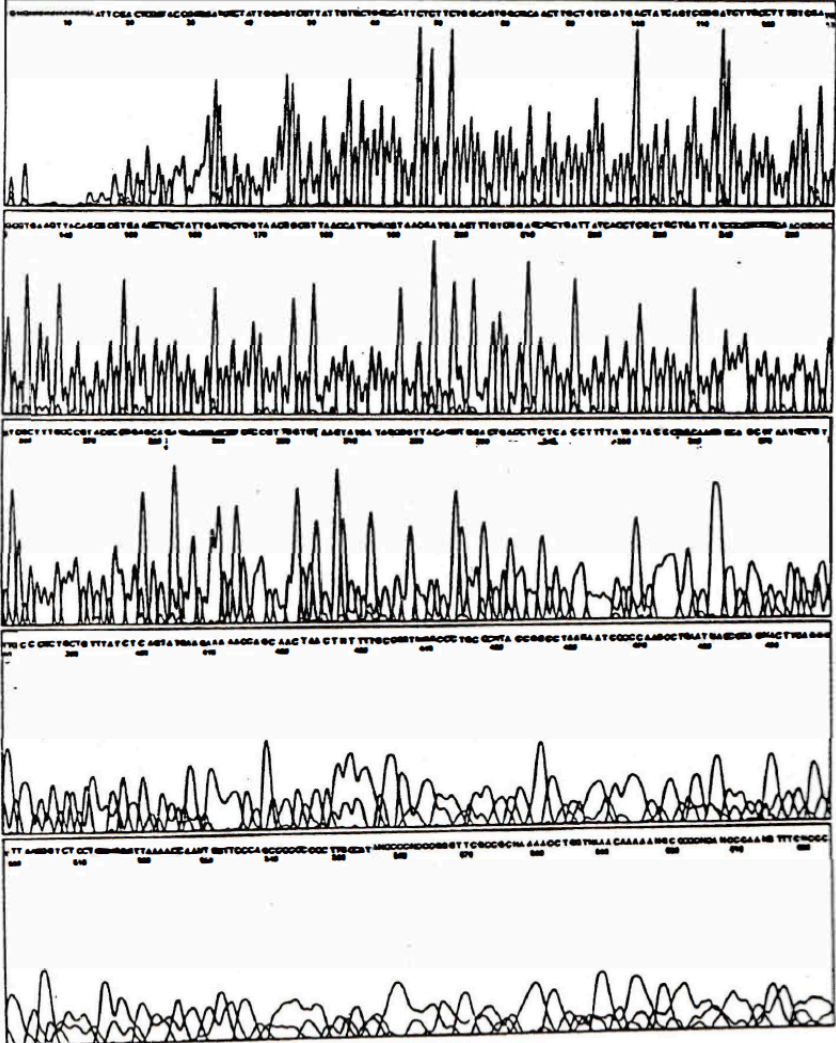


Model
Version 2.1.1

PUC Sm2
Made
PUC 19
Lane 5

Signal G:265 A:579 T:318 C:191
DT6%Ac(A Set-ArryPrimer)
Instrument #708 Matrix
Plate 409 to 8648 Base 1: 408

Page 1 of 1
Thu, Jan 22, 1998 7:37 AM
Wed, Jan 21, 1998 4:57 PM
Spacing: 9.15 ABI50



Primer Reversal

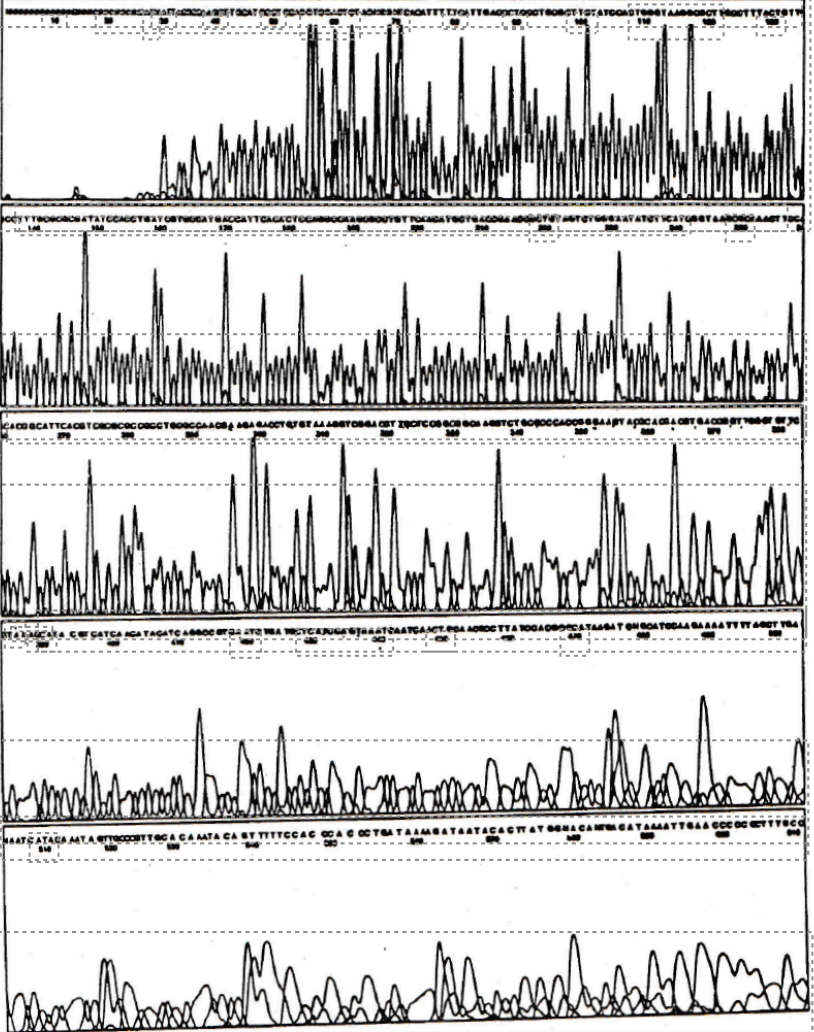


Model: Version 2.1.1

pUC Sm 2
Name: pUC .0
Lane 2

Signal G:485 A:1154 T:588 C:359
D1%:Ac(A Set-AnyPrimer)
Instrument #709-Media
Points 525 to 6048 Base 1: 525

Page 1 of 1
Tue, Jan 27, 1998 7:08 AM
Mon, Jan 26, 1998 4:25 PM
Spacing: 9.31 AB50



Primer : Revers

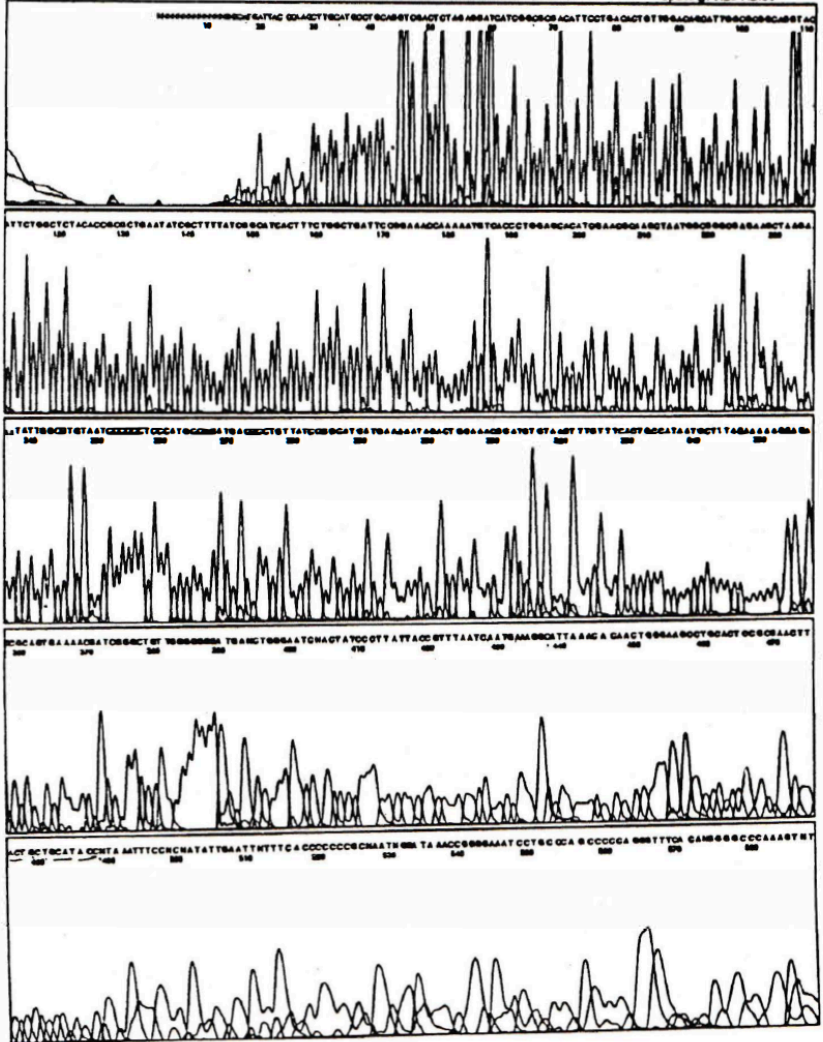


Model
Version 2.1.1

pUC Strm 5
Made
pUC 19
Lane 3

Signal G:326 A:789 T:391 C:215
DT6%Ac(A Set-AnyPrimer)
Instrument #709 Matrix
Points 356 to 8648 Base 1: 356

Page 1 of 1
Tue, Jan 27, 1998 7:07 AM
Mon, Jan 26, 1998 4:25 PM
Spacing: 9.23 ABI50



Primer : Universal

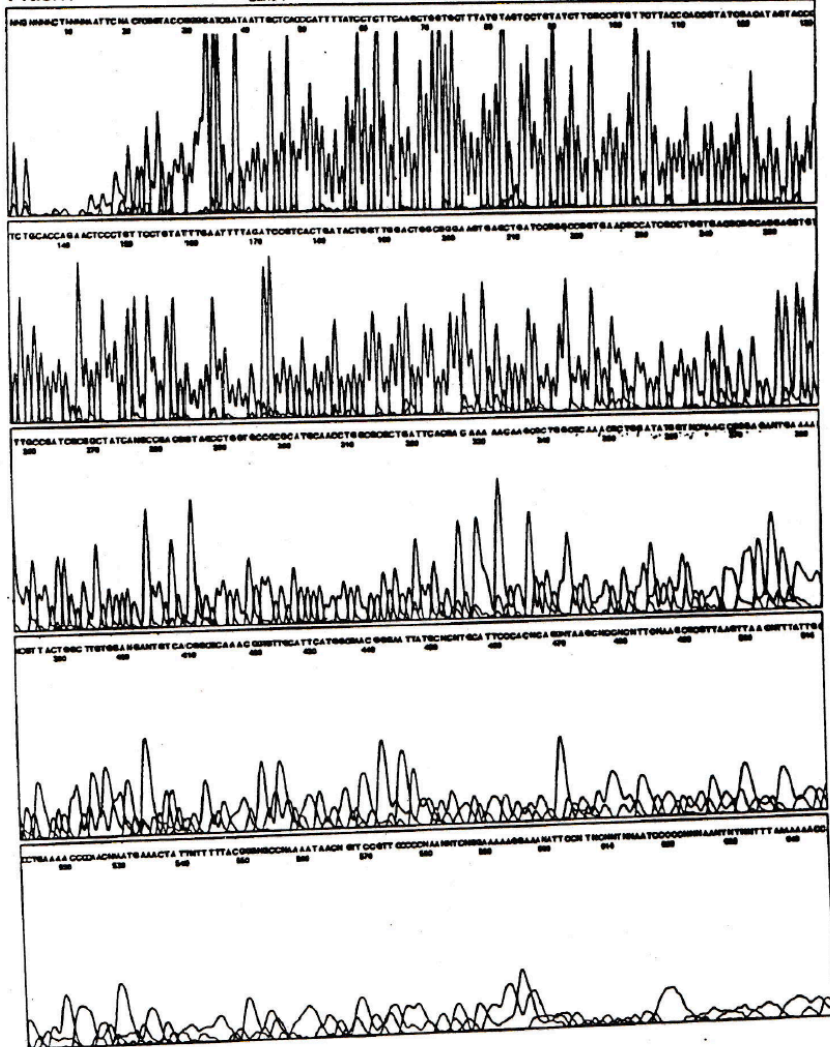


Model
Version 2.1.1

pUC Strm00
Lane 7

Signal G:168 A:368 T:218 C:123
Df6%Ac(A Set-AnyPrimer)
Instrument #709 Matrix
Points 414 to 8648 Base 1: 414

Page 1 of 1
Thu, Jan 22, 1998 7:36 AM
Wed, Jan 21, 1998 4:57 PM
Spacing: 0.251 ABI50



Primer : Revers

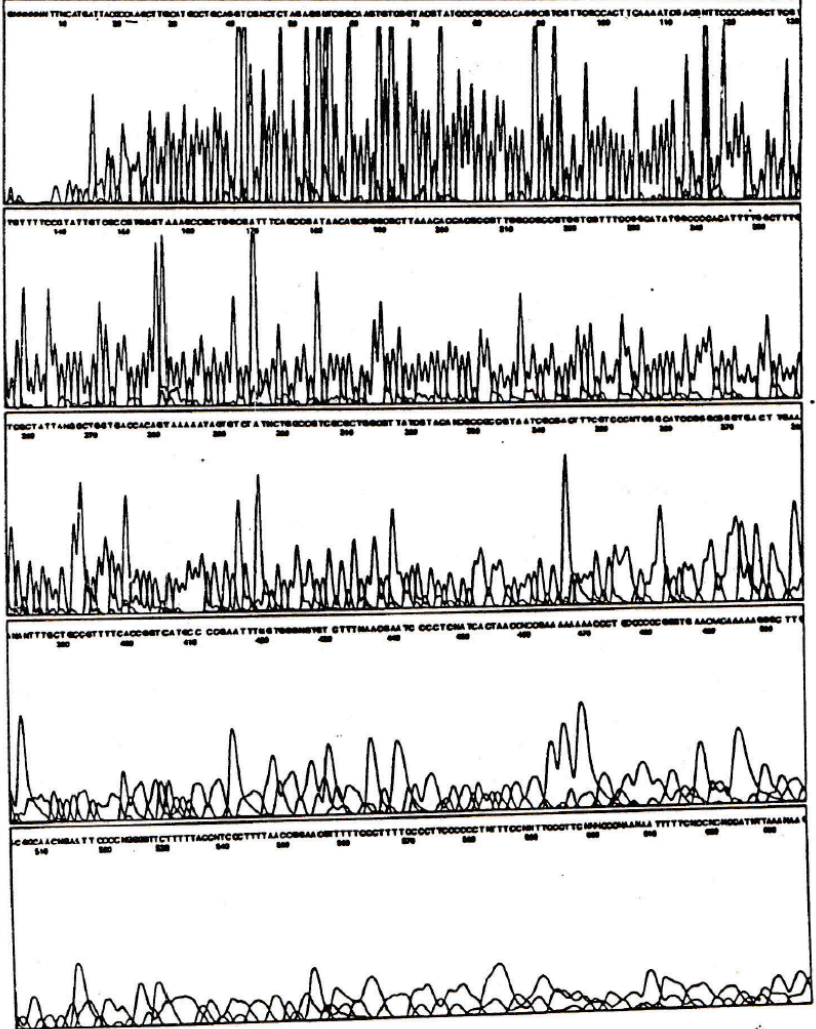


Model
Version 2.1.1

pJC Sm 80
Made
pJC 19
Lane 4

Signal G:361 A:774 T:466 C:315
DT6%Ac(A Set-AnyPrimer)
Instrument #708 Matrix
Points 611 to 6648 Base 1: 611

Page 1 of 1
Tue, Jan 27, 1998 7:08 AM
Mon, Jan 26, 1998 4:25 PM
Spacing: 6.43 ABI50



Query: 305 GAGAAGGTCAGTCCACCTGTAAACCGCTATCATACTTACACCAACGGCGAGCGCCGCATC 246
 || ||||| | || || || || || | ||| | || ||| ||||| || |||||
 Sbjct: 2185 GAAAAGGTTAAACCGCCAGTCACTGCCACCATCCCCACCAAAAACAGCGACACCAGCCATC
 2244

Query: 245 TGCTCCGGCGTACGGGCAAAAGCGACGGCGGTTGCCGGCGGGCATAATCAGCAGCGAGGTG 186
 || ||||| ||||| ||||| ||||| || || || || ||||| || || ||
 Sbjct: 2245 TGTTCGGCGTCCGGGCAAAAGCGACGGCGCAGTAGCAGCAGGAATAATCAGCAACGAAATA
 2304

Query: 185 ATAATCAGCGCTCCGACAACTTCATCGTACGCCAATGGTTAACGCCGTTACCAGCATC 126
 ||||| || ||||| ||||| ||||| || ||||| || || ||||| |||||
 Sbjct: 2305 ATAATCAACGCCCGACAAATTCATCGCTACACCAATCGTCAATGCCGTCACCAGCATC
 2364

Query: 125 AATAGCAGCTTCACGGCGCTGTAACCTTCACGCCATCGACAAAAGGCAAGATCCGGACTGATA 66
 || | || ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| || ||||| || || ||
 Sbjct: 2365 AACAAACAATTCACTCGCTGTAATTCACACCATCAACAAAAGCCAGATCCGGGCTTATC
 2424

Query: 65 GTCATTGACAGCAAGTTGCCGCCACTGCCAGAAGAGAAATGGCCAGCACATAACGACCCCA 6
 ||||| ||||| ||||| ||||| | ||| ||||| || || || || ||
 Sbjct: 2425 GTCATTGACAGCAAAATGCCCCATTGCCAGAACAAAATAGCCACCACGATGACCAGCCCA
 2484

Query: 5 ATAGC 1
 || ||
 Sbjct: 2485 ATCGC 2489

B. Koleksi Genom nomor 5
Primer : Universal

gb|AE000452|Ecae000452 Escherichia coli K-12 MG1655 section 342 of 400
of the complete genome
Length = 10,700

Plus Strand HSPs:

Score = 125 (34.5 bits), Expect = 2.3, P = 0.90
Identities = 61/106 (57%), Positives = 61/106 (57%), Strand = Plus / Plus

Query: 44 GGAATACCTGATTACGCCAGGGCCATCGCGGATATCGCCTGTATTACCGCTGCCCTGTCATAC 103
||| ||| | || | ||| | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
Sbjct: 5738 GCAATATCTGATCGATAAAGGTATACCGGTATCGCCTGTATTACCGGCCCGCTGGATAA 5797

Query: 104 TCCCACCGGCACATCACCGGTAGCGGGTATCGAAGGCGCGTGAA 149
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |

Sbjct: 5798 AACTCGCGCGCGCCTCGCGTGGAAAGTTATCGCGCGCGCATGAAA 5843

Score = 130 (35.9 bits), Expect = 0.89, P = 0.59
Identities = 42/62 (67%), Positives = 42/62 (67%), Strand = Plus / Plus

Query: 257 GCGCTATTCCGCTGTAATGATGACACGCGCGCTGGGCGCGGCAAAAGCGCTGCGCCAAAGCC 316
|| | ||||| ||||| | | | | | | | | | | | | | | | | |||
Sbjct: 3910 GCTGTATTCCGCGCAGAAATGATGAAAATGCGCGCTGGGCGCGCTGCGCGCAACTGCAAACTGCC 3969

Query: 317 GG 318

||
Sbjct: 3970 GG 3971

[](#)

emb|399119|BSUB0016 Bacillus subtilis complete genome (section 16 of 21): from 2997771 to 3213410
Length = 215,640

Plus Strand HSPs:

Score = 128 (35.4 bits), Expect = 1.3, P = 0.73
Identities = 40/58 (68%), Positives = 40/58 (68%), Strand = Plus / Plus

Query: 275 GATGACACGGCCCTGCCCGCGCAAAAAGCGCTGCCCAAGCCCGGATTACCCATCCCCC 332
||| | ||| | ||| | ||| | | | | | | | | | | | | | | | | |
Sbjct: 98852 GATTCTATCGGATCGCGCATTAAGCGCCCTCAGGAAGCCGGACTCCAAAGTCCCCC 98909

[](#)

Query: 36 ccgcttcacaggtgaggcggatctgacttgcatcagaacgagaaaatgatgtttaac 95
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
Sbjct: 8370 ccgcttcacaggtgaaagcggatctgacctgcatcagaacgagagaattatgtttaac 8429

Query: 96 cagaactcctttcgcacgagcgggaacgctgaaaaatgacggtacgctttcgcttacggcg 155
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
Sbjct: 8430 cggaaactcctttcccgcgagggaacgctgaaaaatgacggtacgctttcgcttatggcg 8489

Query: 156 ccgatgccgctctatgccggcaccgcttactctttacgctgacgcaataacgaattca 215
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
Sbjct: 8490 cagatgctgtttatgccggcagcgcgcttatccctgcgctgtgcgcaacaacgaattca 8549

Query: 216 atcacgaaaattgacgcttggcatcacgaagcccacgcgctcgynnnnnnttctacg 275
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
Sbjct: 8550 acccacgaaaatccttcagctcggcatcaatgaagcccacgcgctggggaaaaagttttatg 8609

Query: 276 tggtggtgaacatgccccgcataacgccaagctcaaacctttatccgtgacctgaaac 335
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
Sbjct: 8610 tcgtggtcaacattgcaccgcacaacgccaagctgaaaaacctttatccgtgacctgaaac 8669

Query: 336 ccgctcgtagagatggcggcgatgcgt 363
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
Sbjct: 8670 ccggtggtgaaatggcggcgatgcgt 8697

D. Koleksi genom nomor 2
Primer : Revers M13

b|U27192|ECU27192 Escherichia coli molybdate transport operon (modA, modB, modC, modD), ModE (modE) and ModF (modF) genes, complete cds.

Length = 7683

Minus Strand BSPs:

Score = 980 (270.8 bits), Expect = 2.1e-71, P = 2.1e-71
Identities = 276/376 (73%), Positives = 276/376 (73%), Strand = Minus / Plus

Query: 388 ACATTTTCATTGACCCCTCCCTGGCCTTCTATCCACTGGGTAAGGGCCTTGCCTTTACTG 329
|| |||| ||| |||| || ||||| || | ||| | || | || || ||||| |||
Sbjct: 5517 ACGTTTTCATCGACCAACCTTGGCCCTCAACCCATTTCTGTCAAACGTTTACCTTTGCTG 5576

Query: 328 TTGCCCTTTCGGCGGATATCCACCTGATCGTGCCATGACCATTACACTCCAGGCCAAGC 269
||||| ||| || ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| || ||
Sbjct: 5577 TTGCCCGCGCGTGC AATATCAACCTGATCGTGCCAGGACCATTACACTCCAGTCCAGT 5636

Query: 268 GCCTGTTC AACATGCTGACCGAACCGCTGTAGTCTGGGAATATCTTCATCGGTAAGGCCA 209
| ||||| ||||| ||||| || || |||| | || | || || | || || ||
Sbjct: 5637 TCATGTCGACATGCTTACCAAAATGCTGCAATTCGGCCAGGTCATCGTGCGTCAGGGCG 5696

Query: 208 AACTTCCACACGGCATTACGTCGGCGCGCCCTGCCCCAAACGAAAGACCTGTGTAAAG 149
||||||| ||||| || || | ||||| || ||| ||||| ||| ||||| ||
Sbjct: 5697 AACTTCCATACGGCGTTAACTTGTTCGGCCGTTTCAGCCAGAGAACGGCACTTGTGTAAA 5756

Query: 148 GTCCGACGTTGCTCCGGCGGCAAAAGTCTGCGCCCACCGGGAAGTACGCACGAGGTGACCG 89
||||||| || ||||| || ||||| || ||||| || ||||| || ||||| || |||||
Sbjct: 5757 GTCCGACGCTGTTCCGGCGGCAAGGTTTTCGCCCAAGTATGTCGGAATGACATGCCCG 5816

Query: 88 GTTGGGTGTTGCTAAAGCATAACGTCATCAACATACATCAGGCCGTGAATCTGATGCTCA 29
|| ||||| || || | ||| | ||||| ||||| ||||| || || ||||
Sbjct: 5817 GTCCGGTCTCATAGACCAATGCATCATCGACATACATCAGACCCTGAATGCTGCTTCA 5876

Query: 28 TCCAGTAAATCAATCA 13
| || | |||| |
Sbjct: 5877 TTCAGCATCTCAATGA 5892

Lampiran 3. Analisis homologi asam amino beberapa klon koleksi Genom *S. typhimurium*.

A. Koleksi Genom nomor 2.

sp|P39632|YEBI_ECOLI HYPOTHETICAL 27.8 KD PROTEIN IN M88B-RUVB INTERGENIC REGION gnl|PID|d1016391 (D90628) ORF_ID:o336gap#12; similar to [SwissProt Accession Number P39632] [Escherichia coli] gnl|PID|d1016394 (D90629) ORF_ID:o336gap#12; similar to [SwissProt Accession Number P39632] [Escherichia coli] gi|1788166 (AE000280) hypothetical 27.8 kd protein in m88b-ruvb intergenic region [Escherichia coli] Length = 261

Score = 537 (256.5 bits), Expect = 1.1e-68, P = 1.1e-68
Identities = 112/131 (85%), Positives = 115/131 (87%)

Query: 1 AIGVVIVLAILFWQWRNLLSNTISPDIAFVDCVKLQRVKLLMLVLTALITGVNMFVGCAL 60
AIGVVIVLAILFWQWRNLLSNTISPDIAFVDCVKLQRVKLLMLVLTALITGV NMFVGCAL
Sbjct: 131 AIGVVIVVAILFWQWRNLLSNTISPDIAFVDCVKLQRVKLLMLVLTALITGVNMFVGCAL 190

Query: 61 IITPELLIDPXXXXXXXXXXPEQMGAVGVENLAVTCGLTFSAFYDTFARPSVNLCAALL 120
IITPELLIDP PEQMGAVAV V N+AVTQGLTFS A YDTPA PSV+LCAALL
Sbjct: 191 IITPELLIDPAATARRFARTPEQMGAVAVLGVNVAVTCGLTFSAVIDTACPSVNLCAALL 250

Query: 121 FILSNKKQAS 131
FI SNKKQAS
Sbjct: 251 FILSNKKQAS 261

sp|P44691|YEBI_HAEM HYPOTHETICAL PROTEIN HI0407 pir||A64066 hydrophobic membrane protein homolog - Haemophilus influenzae (strain Rd KW20) gi|1573380 (U32724) hydrophobic membrane protein [Haemophilus influenzae] Length = 261

Score = 359 (171.5 bits), Expect = 4.3e-43, P = 4.3e-43
Identities = 67/128 (52%), Positives = 96/128 (76%)

Query: 2 DGVVIVLAILFWQWRNLLSNTISPDIAFVDCVKLQRVKLLMLVLTALITGVNMFVGCALI 61
IGV+IVL+ L + W+LLS T+SP+LA V+C+ +++++ +LN++TALTI ++MFVGCALI
Sbjct: 132 DGVVIVLSTLIYFQWRNLLSNTISPDIAFVDCVKLQRVKLLMLVLTALITGVNMFVGCALI 191

Query: 62 IITPELLIDPXXXXXXXXXXPEQMGAVGVENLAVTCGLTFSAFYDTFARPSVNLCAALL 121
IITPELLIDP PE N C A+ +SN+++ GCL SAFYDT A PSV++C+A LF
Sbjct: 192 IITPELLIDPAATARRFARTPEQMGAVGVENLAVTCGLTFSAFYDTAAGPSVNLCAALL 251

Query: 122 IFSNKKQ 129
+ S+ K++
Sbjct: 252 VLKLFKRE 259

B. Koleksi Genom nomor 81

```
PRE>
<a name = 2499891> </a><a href="/htbin-
post/Entrez/query?form=6&dopt=gcd&pcuid=02499891">sp|P76403|YEGQ_ECOLI<
/a> PUTATIVE PROTEASE IN BAER-OCRI INTERGENIC REGION
>gi|1736789|gnl|PID|d1016660 (D90846) Collagenase
precursor (EC 3.4.--). [Escherichia coli]
>gi|1736801|gnl|PID|d1016671 (D90847) Collagenase
precursor (EC 3.4.--). [Escherichia coli] >gi|1788397
(AF000298) o453; This 453 aa ORF is 80 pct identical (4
gaps) to 450 residues of an approx. 464 aa protein
YBU_HAEIN SW: P44700 [Escherichia coli]
Length = 453
```

Score = 184 bits (463), Expect = 1e-46
Identities = 91/92 (98%), Positives = 91/92 (98%), Gaps = 1/92 (1%)

```
Query: 22 MFKPELLSPACTLKNHRYAFAYGADAVIAGQPRYELRVNNEFVNEHNLQCGINEAHALGK
81
MFKPELLSPACTLKNHRYAFAYGADAVIAGQPRYELRVNNEFVNEHNLQCGINEAHALGK
Sbjct: 1 MFKPELLSPACTLKNHRYAFAYGADAVIAGQPRYELRVNNEFVNEHNLQCGINEAHALGK
60
```

```
Query: 82 FFFVVMNIAPH-AELKTFIRDLEKPVVVEGPD 112
FFFVVMNIAPH AELKTFIRDLEKPVVVEGPD
Sbjct: 61 FFFVVMNIAPH-AELKTFIRDLEKPVVVEGPD 92
```

```
<PRE>
<a name = 1176181> </a><a href="/htbin-
post/Entrez/query?form=6&dopt=gcd&pcuid=01176181">sp|P44700|YEGQ_HAEIN<
/a> PUTATIVE PROTEASE H10419 >gi|1073949|pir||G64066 collagenase (prtC)
homolog - Haemophilus influenzae (strain Rd KW20)
>gi|1573393 (U32725) collagenase (prtC) [Haemophilus
influenzae]
Length = 460
```

Score = 164 bits (412), Expect = 1e-40
Identities = 78/91 (85%), Positives = 88/91 (95%), Gaps = 1/91 (1%)

```
Query: 23 FFKPELLSPACTLKNHRYAFAYGADAVIAGQPRYELRVNNEFVNEHNLQCGINEAHALGK
82
FFKPELLSPACTLKNHRYAFAYGADAVIAGQPRYELRVNNEFVNEHNLQCGINEAHALGK
Sbjct: 5 FFKPELLSPAGLKNHRYAFAYGADAVIAGQPRYELRVNNEFVNEHNLQCGINEAHALGK
64
```

```
Query: 83 FFFVVMNIAPH-AELKTFIRDLEKPVVVEGPD 112
FFFVVMNIAPH +ELKTFI+DL+PV++H PDA
Sbjct: 65 FFFVVMNIAPH-AELKTFIKDLQPVVDWPD 95
```

Koleksi Genom nomor 80

sp|P75746|YBGL_ECOLI HYPOTHETICAL 25.8 KD PROTEIN IN PRRS-NKI INTERGENIC REGION gi|1786931 (AE000174) o244; This 244 aa ORF is

52 pct identical (0 gaps) to 243 residues of an approx. 264 aa protein

YH29_HAEMIN SW: P45347 [Escherichia coli]
Length = 244

Score = 212 (99.3 bits), Expect = 6.9e-22, P = 6.9e-22
Identities = 42/56 (75%), Positives = 50/56 (89%)

Query: 3 DPSELILVGLAGSELIRAGERHRLVTRQEVFADRGYQADGSLVPRMOPGALIHDKK 58
DP+LILVGLAGSELIRAG+++ L TR+EVFADRGYQADGSLVPR Q GALI ++ +
Sbjct: 131 DPALILVGLAGSELIRAGKQYGLTTREVFADRGYQADGSLVPRBQSGALIENEEQ 186

sp|P45347|YBGL_HAEMIN HYPOTHETICAL PROTEIN HI1729 pir|H64138 lactam utilization protein (lamB) homolog - Haemophilus influenzae (strain

Rd KW20) gi|1574585 (U32845) lactam utilization protein (lamB) [Haemophilus influenzae]
Length = 257

Score = 150 (70.3 bits), Expect = 3.8e-13, P = 3.8e-13
Identities = 30/51 (58%), Positives = 37/51 (72%)

Query: 3 DPSELILVGLAGSELIRAGERHRLVTRQEVFADRGYQADGSLVPRMOPGALI 53
DP+L L+GLAGS ++R E +L T EVFADR Y DGSVPR QP A++
Sbjct: 144 DPKLKLMLAGSELMLRIAREEKLOTIBEVFADRRYHPDGSVPRBOPNANW 194

gi|2290993 (AF006000) unknown [Bordetella pertussis]
Length = 252

Score = 144 (67.5 bits), Expect = 2.7e-12, P = 2.7e-12
Identities = 32/54 (59%), Positives = 35/54 (64%)

Query: 2 LDPELILVGLAGSELIRAGERHRLVTRQEVFADRGYQADGSLVPRMOPGALIH 55
+D L+L GLAGS LI A L QEVFADR YQADG L PR QP A+I D
Sbjct: 137 VDSDLVLYGLAGSALIDAAARAIGLRAAEVFPADRTYQADGCLTPRBPDMITD 190

Lampiran 4 Prediksi Struktur Sekunder Zhou-Fasman

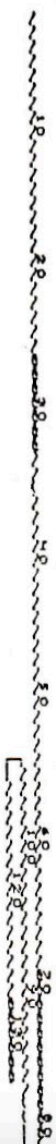
Chou-Fasman Cartoon of MUUCM151.nsc



Chou-Fasman Cartoon of MUUCM151.nsc



Chou-Fasman Cartoon of MUUCM151.nsc



u = Helix s = Sheet t = Turn c = Coil

BIODATA PENULIS



Drs. Made Sukaryawan, M.Si., Ph.D merupakan dosen Pendidikan Kimia FKIP UNSRI yang lahir di Karang Asem pada tanggal 5 Agustus 1965. Beliau menyelesaikan studi S1 Pendidikan Kimia di Universitas Sriwijaya tahun 1990. S2 Kimia-Biokimia di Institut Teknologi Bandung tahun 1998 dan melanjutkan kuliah S3 pada Program Doktor Pendidikan Kimia di Universiti Pendidikan Sultan Idris yang selesai pada tahun 2019.


www.bening-mediapublishing.com
 **0823 7200 8910**

ISBN 978-623-5854-94-6

