

ABSTRAK

ISOLASI, OPTIMASI AMPLIFIKASI DAN KLONING GEN *phoQ* PADA *Salmonella typhi*

Patrisia Puspapriyanti, 2008. Pembimbing I : Ernawati A.Girirachman, Ph.D.
Pembimbing II : Johan Lucianus, dr., M.Si.

Salmonella typhi adalah bakteri penyebab demam tifoid. Masalah utama dari terapi demam tifoid adalah adanya resistensi obat. PhoP-PhoQ *two component system* adalah regulator berbagai faktor virulensi dari *Salmonella typhi* yang dapat digunakan sebagai target untuk antibiotik baru.

Tujuan utama dari penelitian ini adalah melakukan isolasi DNA, optimasi amplifikasi dan kloning dari gen *phoQ* yang akan digunakan untuk sistem *screening* antibiotik baru dalam terapi demam tifoid.

DNA *S.typhi* diisolasi menggunakan *Wizard Isolation Kit* dan dilakukan PCR untuk mengamplifikasi gen *phoQ* menggunakan primer PhoQFWD dan PhoQREV, kemudian dilakukan kloning menggunakan vektor pGEM-T easy. Hasil kloning dikultur pada medium LB agar yang mengandung ampicillin, IPTG dan X-gal, dan dianalisis menggunakan metode lisis cepat.

Isolasi DNA digunakan untuk mendapatkan kromosom *Salmonella typhi*. PCR dilakukan dengan jumlah siklus 30 siklus, tahap denaturasi 94°C selama 1 menit, tahap *annealing* 53°C selama 1 menit, tahap ekstensi 72°C selama 2 menit, dan kemudian hasilnya memperlihatkan pita diantara 1000 dan 1500 pb, mendekati ukuran yang diharapkan yaitu 1464 pb. Hasil kloning adalah 37 koloni putih dan 11 koloni biru. Setelah dilisis cepat, diperkirakan koloni 9, 18, 24 dan 34 mengandung DNA sisipan.

Kata kunci : *Salmonella typhi*, PhoP-PhoQ *two component system*, isolasi DNA, PCR, kloning.

ABSTRACT

ISOLATION , OPTIMATION OF AMPLIFICATION, AND CLONING OF *phoQ* GENE OF Salmonella typhi

Patrisia Puspapriyanti, 2008. First Tutor : Ernawati A.Girirachman, Ph.D.
Second tutor: Johan Lucianus, dr., M.Si.

Salmonella typhi is a cause of typhoid fever. The major problem in the therapy is drug resistancy. *PhoP-PhoQ* two component system is regulator of many virulent factors of *Salmonella typhi* that can be used as a target for new antibacterial agents.

The main goal of this research is to isolate the DNA, optimate *phoQ* gene amplification, and clone the gene, which will be used as a part of novel screening system for searching new antibacterial agents against *Salmonella typhi*.

S. typhi genome was isolated by Wizard Isolation Kit, and then PCR was done using *PhoQFWD* and *PhoQREV* as primers. *phoQ* was cloned using *pGEM-T* easy vector. The result was grown in LB agar medium contains ampicillin, IPTG and X-gal, and plasmid with DNA insert was characterized with fast lysis method.

The result of DNA isolation is total cell DNA from *Salmonella typhi*. PCR was performed in 30 cycles, denaturation at 94°C for a minute, annealing at 53°C for a minute, extension at 72°C for 2 minutes, and the result shown a band between 1000 and 1500 bp which is closed to the expected size 1464 bp. The result of cloning were 37 white colonies and 11 blue colonies. After fast lysis, the colony number 9, 18, 24 and 34 are predicted to be inserted with DNA target.

Keywords : *Salmonella typhi*, *PhoP-PhoQ* two component system, DNA isolation, PCR,cloning.

DAFTAR ISI

DAFTAR ISI	Halaman
HALAMAN DALAM.....	i
LEMBAR PERSETUJUAN.....	ii
SURAT PERNYATAAN.....	iii
ABSTRAK.....	iv
ABSTRACT.....	v
PRAKATA.....	vi
DAFTAR ISI.....	viii
DAFTAR TABEL.....	x
DAFTAR GAMBAR.....	xi
DAFTAR GRAFIK.....	xii
BAB I PENDAHULUAN	
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Identifikasi Masalah.....	3
1.3 Maksud dan Tujuan.....	3
1.4 Manfaat Penelitian.....	3
1.4.1 Manfaat Akademik.....	3
1.4.2 Manfaat Praktis.....	4
1.5 Metodologi Penelitian.....	4
1.6 Lokasi dan Waktu Penelitian.....	4
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	
2.1 <i>Salmonella typhi</i>	5
2.1.1 Karakteristik Mikrobiologi <i>Salmonella typhi</i>	6
2.1.2 Patogenesis.....	7
2.1.3 Faktor Virulensi.....	9
2.1.4 Terapi dan Resistensi Antibiotik.....	10
2.1.5 <i>Two Component System</i>	11
2.1.5.1 <i>PhoP-PhoQ Two Component System</i>	13
2.2 Teknik Kloning.....	18
2.2.1 Isolasi Kromosom.....	18
2.2.2 <i>Polymerase Chain Reaction (PCR)</i>	19
2.2.3 Gel Elektroforesis.....	22
2.2.4 Kloning Gen.....	23
2.2.4.1 Vektor pGEM-T easy.....	26
BAB III BAHAN DAN METODE PENELITIAN	
3.1 Objek Penelitian.....	28
3.2 Bahan dan Alat Penelitian.....	28
3.2.1 Bahan Penelitian.....	28

3.2.2 Alat Penelitian.....	29
3.3 Metode Penelitian.....	30
3.4 Prosedur Penelitian.....	30
3.4.1 Tahap I : Isolasi DNA.....	30
3.4.2 Tahap II : PCR.....	31
3.4.2.1 Amplifikasi DNA Pengkode Gen <i>gyrA</i> Bagian QRDRs.....	31
3.4.2.2 Amplifikasi DNA Pengkode Gen <i>phoQ</i>	31
3.4.3 Tahap III : Kloning Gen.....	32
3.4.3.1 Pemurnian DNA Pengkode <i>phoQ</i> dari Hasil PCR Menggunakan <i>DNA Purification Kit</i>	32
3.4.3.2 Ligasi DNA pengkode <i>phoQ</i> ke Vektor Kloning pGEM-T easy.....	33
3.4.3.3 Transformasi pGEM-T Rekombinan yang Mengandung DNA Pengkode <i>phoQ</i> ke <i>E. coli</i> DH5.....	33
3.4.3.4 Karakterisasi pGEM-T rekombinan.....	34
BAB IV HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN	
4.1 Penanaman Sampel pada Medium Salmonella-Shigella.....	35
4.2 Isolasi DNA Kromosom <i>Salmonella typhi</i>	35
4.3 PCR DNA pengkode gen <i>gyrA</i> Bagian QRDRs.....	36
4.4 PCR DNA Pengkode gen <i>phoQ</i>	37
4.5 Kloning Bagian Gen <i>phoQ</i> Menggunakan Vektor pGEM-T easy.....	40
BAB V KESIMPULAN DAN SARAN	
5.1 Kesimpulan.....	44
5.2 Saran.....	45
DAFTAR PUSTAKA	46
RIWAYAT HIDUP	48

DAFTAR TABEL

DAFTAR TABEL	Halaman
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	
Tabel 2.1 Gen dan Aktivitas Seluler yang Diregulasi oleh PhoP-PhoQ pada Bakteri <i>Salmonella</i>	14

DAFTAR GAMBAR

DAFTAR GAMBAR	Halaman
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	
Gambar 2.1 <i>Salmonella typhi</i> pada Pewarnaan Gram.....	5
Gambar 2.2 Patogenesis Kuman <i>Salmonella typhi</i>	8
Gambar 2.3 Struktur Dasar LPS pada Bakteri Gram Negatif.....	9
Gambar 2.4 Bagan Kerja <i>Two Component System</i>	12
Gambar 2.5 Struktur dari PhoQ (A); Mekanisme Pengikatan Kation dan Peptida Antimikroba oleh PhoQ (B).....	15
Gambar 2.6 Tahap – tahap PCR.....	21
Gambar 2.7 Amplifikasi Gen Secara Eksponensial pada PCR.....	22
Gambar 2.8 Gel Elektroforesis.....	23
Gambar 2.9 Proses Kloning dengan Menyisipkan DNA pada Vektor.....	24
Gambar 2.10 Vektor pGEM-T easy.....	27
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN	
Gambar 4.1 Kultur ST 07 dan ST 11 pada SS Agar.....	35
Gambar 4.2 Elektroforesis DNA Kromosom.....	36
Gambar 4.3 Hasil PCR <i>phoQ</i> dengan Variasi Jumlah Primer; Kontrol Positif <i>gyrA</i> pada Lajur 6.....	38
Gambar 4.4 Hasil PCR <i>phoQ</i> dengan Variasi Suhu Annealing; Kontrol Positif <i>gyrA</i> pada Lajur 5 dan 6.....	39
Gambar 4.5 Kultur Hasil Proses Transformasi pada Medium LB Agar yang Mengandung Ampicillin, IPTG dan X-gal.....	41
Gambar 4.6 Kultur Kontrol Negatif pada Medium LB Agar.....	41
Gambar 4.7 Analisa Migrasi Plasmid Rekombinan.....	42

DAFTAR GRAFIK

DAFTAR GRAFIK	Halaman
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	
Grafik 2.1 Gambaran <i>Salmonella typhi</i> yang Resisten Antibiotik; Data Diambil dari Vietnam Selatan dari Tahun 1993 Sampai 2005	11