



LAPORAN PENELITIAN

**Kloning, Karakterisasi dan Overekspresi
Gen *carB* *Salmonella typhi* Yang Mengkode Carbamoyl
Phosphat Syntetase Subunit B**

Oleh
Dra. Elisawati Wonohadi M.Si Apt
Dra. Mariana Wahyudi M.Si

**SURAT KEPUTUSAN PELAKSANAAN PENELITIAN
NO. 09/Lit/LPPM/FF/III/2004
LEMBAGA PENELITIAN DAN PENGABDIAN KEPADA MASYARAKAT
UNIVERSITAS SURABAYA**

**FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS SURABAYA
2005**

**SISTEMATIKA LAPORAN AKHIR HASIL
PENELITIAN DASAR**

	Halaman
LEMBAR IDENTITAS DAN PENGESAHAN	2
RINGKASAN	3
PRAKATA	4
DAFTAR GAMBAR	5
DAFTAR LAMPIRAN	6
I. PENDAHULUAN	7
II. TINJAUAN PUSTAKA	
2.1 Tinjauan tentang <i>Salmonella typhi</i>	7
2.2 Tinjauan tentang Gen <i>carB S. typhi</i>	8
2.3 Tinjauan tentang <i>E. coli</i>	8
2.4 Tinjauan tentang Kloning Gen	8
2.5 Tinjauan tentang Proses Seleksi Klon Rekombinan	12
2.6 Tinjauan tentang Analisis Hasil Pematangan Endonuklease Restriksi	13
2.7 Tinjauan tentang Elektroforesis Gel Agarosa	13
2.8 Tinjauan tentang Sekuensing	14
III. TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN	14
IV. METODE PENELITIAN	
4.1 Bahan-bahan Penelitian	14
4.2 Bahan-bahan Kimia	14
4.3 Alat-alat yang Digunakan	15
4.4 Metode Kerja	15
V. HASIL DAN PEMBAHASAN	
5.1 Preparasi Vektor pET-16b/B/N	18
5.2 Preparasi Gen <i>carB</i> -11-ST/B/N	18
5.3 Proses Transformasi	20
5.4 Seleksi Koloni Hasil Transformasi	21
VI. KESIMPULAN DAN SARAN	23
DAFTAR PUSTAKA	23
LAMPIRAN	25

RINGKASAN

Tifus atau demam tifoid adalah golongan penyakit demam yang disebabkan oleh infeksi *Salmonella typhi*. Usaha penanggulangan penyakit ini melalui diagnosis, terapi dan imunisasi memerlukan pengetahuan tentang mekanisme molekular patogenitasnya serta respon sel inang terhadap *Salmonella typhi*.

Dari penelitian sebelumnya melalui system IVET (*in vivo expression technology*) berhasil ditemukan gen-gen bakteri *Salmonella typhimurium* LT2 yang memiliki homologi dengan operon *carAB* *E. coli* K12 yaitu yang mengkode pembentukan enzim karbamoil fosfat sintetase sub unit A dan sub unit B. Kedua sub unit ini berperan dalam biosintesis arginin dan pirimidin serta diduga berperan penting terhadap proses infeksi demam mirip tifoid pada mencit dan sifat virulensi dari *Salmonella typhimurium*.

Penelitian mengenai struktur gen *carA* *Salmonella typhi* telah dilakukan dan dilanjutkan dengan studi fungsi gen tersebut. Saat ini penelitian tentang fungsi gen *carB* *S. typhi* belum selesai dilakukan. Wahyudi M et.al. (2001) telah berhasil melakukan amplifikasi gen *carB* *Salmonella typhi* dan melakukan kloning gen *carB* *S. typhi* tersebut menggunakan vektor pGem-T dengan sel inang *E. coli* XL10.

Pada penelitian ini akan dilakukan kloning gen *carB* tersebut menggunakan vektor ekspresi pET-16b dan sel inang *E. coli* JM109, kemudian melakukan overekspresinya. Melalui hasil penelitian ini diharapkan dapat meletakkan landasan dalam memahami mekanisme patogenitas penyakit tifus pada tingkat molekul yang diduga kuat berkaitan dengan sifat virulensi *S. typhi*.

Kloning gen *carB* *S. typhi* diawali dengan mempersiapkan vektor pET-16b/B/N dan gen *carB*-11-ST/B/N.

Vektor pET-16b/B/N didapat dari plasmid rekombinan pET-*carA*-ST yang diisolasi dari biakan *E. coli* DH5 α (pET-*carA*-ST) dengan melakukan pemotongan menggunakan enzim *Bam*HI dan *Nde*I. Sedangkan gen *carB*-11-ST/B/N didapat dengan melakukan pemotongan pada plasmid rekombinan pG-*carB*-11-ST dari biakan *E. coli* XL10(pG-*carB*-11-ST) menggunakan enzim restriksi *Bam*HI, setelah terpotong sempurna dilanjutkan dengan pemotongan oleh enzim *Nde*I.

Selanjutnya setelah proses ligasi menggunakan enzim bakteriofage T4 DNA ligase dengan berbagai perbandingan vektor:insert (1:3, 1:5 dan 1:6) dilakukan proses transformasi sel *E. coli* JM109 yang telah dibuat kompeten dengan perlakuan *heat shock* dan larutan CaCl₂ dingin.

Telah dilakukan 5 kali proses transformasi dan diperoleh 369 koloni transforman.

Seleksi koloni hasil transformasi dilakukan dengan memperkirakan ukuran plasmid yang diisolasi dari koloni hasil transformasi, dibandingkan dengan ukuran plasmid pET-16b sirkular. Plasmid yang memiliki ukuran lebih besar dari pET-16b sirkular merupakan plasmid yang diduga membawa DNA *insert* yaitu gen *carB*.

Dari hasil analisis ternyata tidak ada satupun plasmid yang memiliki ukuran lebih lebih besar dari pET-16b sirkular, dengan perkataan lain yang diduga membawa DNA *insert* gen *carB*. Disarankan untuk melakukan pengulangan terhadap pelaksanaan kloning ini dengan menggunakan sel inang *E. coli* JM109 atau dengan sel inang *E. coli* XL10 yang dapat digunakan untuk plasmid-plasmid berukuran sampai dengan 25 kb dan memiliki efisiensi kloning yang besar.

sehingga digolongkan dalam kelompok *competent cells*. Kelemahan ini merupakan penyebab sedikitnya koloni transforman yang tumbuh. Oleh sebab itu perlu adanya pemilihan sel inang baru yang memiliki aktivitas transformasi yang lebih besar dibandingkan dengan *E. coli* JM109. *E. coli* XL10 merupakan pilihan yang tepat dalam mengatasi permasalahan ini. *E. coli* XL10 dapat digunakan untuk plasmid-plasmid berukuran sampai dengan 25 kb, memiliki efisiensi kloning yang besar, dapat digunakan untuk DNA yang mengalami ligasi (DNA rekombinan) dan dapat digunakan untuk perpustakaan plasmid dengan kapasitas transformasi 5×10^9 transforman/ μg sehingga digolongkan dalam kelompok *ultracompetent cells* (http://www.stratagene.com/newsletter/vol10_2/p37-38.htm).

VI. KESIMPULAN DAN SARAN

Dari penelitian yang telah dilakukan, usaha kloning gen *carB* *S. typhi* menggunakan vektor ekspresi pET-16b dengan sel inang *E. coli* JM109 memberikan hasil:

1. Gen *carB* *S. typhi* yang telah diligasikan ke dalam vektor ekspresi pET-16b dan di transformasikan ke dalam sel inang *E. coli* JM109, memberikan hasil 369 koloni transforman.
2. Seleksi terhadap koloni-koloni transforman belum memberikan hasil seperti yang diharapkan.

Untuk kelanjutan penelitian ini, maka disarankan:

1. Melakukan pengulangan terhadap pelaksanaan kloning ini dengan menggunakan sel inang *E. coli* JM109 sehingga diperoleh koloni transforman yang lebih banyak sehingga memperbesar kemungkinan didapatkan koloni transforman yang mengandung DNA rekombinan dengan *insert* gen *carB*.
2. Melakukan kloning gen *carB* *S. typhi* menggunakan vektor ekspresi pET-16b dengan sel inang *E. coli* XL10.

DAFTAR PUSTAKA

1. Rudiretna A., 1998, **Gen Mirip *carA* Pada *Salmonella typhi***, Disertasi, Program Pascasarjana, Institut Teknologi Bandung, Indonesia.
2. Mahan Michael J; Slauch J.M.; Mekalanos J.J., 1993, **Selection of Bacterial Virulence Genes That Are Specifically Induced in Host Tissues**, Science vol 259; 686-688
3. Wahyudi M., Wonohadi E., Rudiretna A., Purwantini E., A.S. Noer, and Oei Ban Liang, 2001, **Proceeding Indonesian Biotechnology Conference**, Indonesia.
4. Gupte, Satish, 1990, **Mikrobiologi Dasar**, Alih bahasa oleh Dr. Julius E. S., edisi ketiga, Binarupa Aksara, Jakarta, 272.
5. Moffet L.Hugh, 1980, **Clinical Microbiology**, Second Edition, J.B.Lippincott Company, Philadelphia, 41-46
6. Staf Pengajar Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia, 1994, **Buku Ajar Mikrobiologi Kedokteran**, Edisi revisi, Penerbit Binarupa Aksara, Jakarta, 154, 163-165, 168-173.
7. Jawetz E., Melnick J.L. and Adelberg E.A., 1986, **Mikrobiologi untuk Profesi Kesehatan (Review of Medical Microbiology)**, Alih bahasa oleh dr. Gerard Bonang, 16th edition, Cetakan IV, Penerbit Buku Kedokteran EGC, Jakarta, 176-253.
8. Ketchum Paul A., 1988, **Microbiology Concepts and Applications**, John Wiley & Sons, New York, 85, 726-727.
9. Salle A. J., 1961, **Fundamental Principles of Bacteriology**, Fifth edition, McGraw-Hill Book Company, Inc., 732-737.

10. Nyunoya, Hiroshi, C. J. Lusty, 1983, **The *carB* Gene of *Escherichia coli*: A Duplicated Gene Coding for the Large Subunit of Carbamoyl-Phosphate Synthetase**, *Biochemistry*, 80: 4629-4633.
11. Guy H. I., Rotgeri A, and Evans D.R., 1997, **Activation by Fusion of the Glutaminase and Synthetase Subunits of *Escherichia coli* Carbamoyl-Phosphate Synthetase**, *JBC Online*. 272(32): 19913-18.
12. Muladno, 2002, **Seputar Teknologi Rekayasa Genetika**, Pustaka Wirausaha Muda, Bogor, 29-30.
13. Greenstein, David, 1987, ***Escherichia coli*, Plasmids, and Bacteriophages**, Massachusetts General Hospital and Harvard Medical School.
14. Brown T.A., 1995, **Gene Cloning an Introduction**, 3rd ed., Chapman & Hall, London..
15. Watson D. James, Tooze John, Kurtz David T., 1988, **DNA Rekombinan, Suatu Pelajaran Singkat**, Alih bahasa oleh Wisnu Gunarso, Penerbit Erlangga, Jakarta, 85-104.
16. Alberts Bruce et.al., 1994, **Biologi Molekuler Sel**, Alih bahasa oleh Alex Tri Kantjono W., edisi kedua, Penerbit PT Gramedia Pustaka Utama, Jakarta, 291-317.
17. Klug William S., Cummings Michael R., 1994, **Concept of Genetics**, Fourth edition, Macmillan College Publishing Company, New York, 383-390.
18. Armstrong B. Frank, 1995, **Buku Ajar Biokimia**, Alih bahasa oleh dr. R.F. Maulany, edisi 3, Penerbit Buku Kedokteran, Jakarta, 185-190, 390-393.
19. Kimbali John W., 1987, **Biologi**, Alih Bahasa Prof.DR.Ir.H.Siti Soetami T., edisi lima, Penerbit Erlangga, Jakarta, 91-94
20. Old R. W., Primrose S.B., 1989, **Principles of Gene Manipulation an Introduction to Genetic Engineering**, Fourth edition, Volume 2, Blackwell Scientific Publications, Oxford London.
21. Sardjoko, 1991, **Bioteknologi, Latar Belakang dan Beberapa Penerapannya**, Penerbit PT Gramedia Pustaka Utama, Jakarta.
22. Budiyanto, Agus K., 2003, **Mikrobiologi Terapan**, Edisi Pertama, Penerbit Universitas Muhammadiyah Malang, Malang, 265-268
23. Sambrook J., Fritsch E.F. and Maniatis T., 1986, **Molecular Cloning**, second edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, USA, 1.68-1.69,1.76-1.84,6.3-6.13.
24. Anonim, 2004, http://www.stratagene.com/newsletter/vol10_2/p37-38.htm