

ISOLASI, AMPLIFIKASI DAN KARAKTERISASI GEN *fim*-C BAKTERI

Salmonella typhi* DAN *Shigella dysenteriae

SKRIPSI

Disusun untuk melengkapi syarat - syarat guna memperoleh gelar

Sarjana Sains



DINI NURKHASANAH

3325120248

PROGRAM STUDI KIMIA

FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM

UNIVERSITAS NEGERI JAKARTA

2017


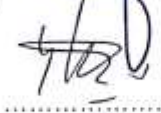



LEMBAR PENGESAHAN SKRIPSI

ISOLASI, AMPLIFIKASI DAN KARAKTERISASI GEN *fim-C* BAKTERI

Salmonella typhi DAN *Shigella dysenteriae*

Nama : Dini Nurkhasanah

No. Reg : 3325120248

Nama	Tanda Tangan	Tanggal
Penanggung Jawab		10/2/2017
Dekan : <u>Prof. Dr. Suyono, M.Si</u> NIP. 19671218 199303 1 005		
Wakil Penanggung Jawab		16/2/2017
Pembantu Dekan I: <u>Dr. Muktiningsih N., M.Si</u> NIP. 19640511 198903 2 001		
Ketua : <u>Dr. Yusmaniar, M.Si</u> NIP. 19620626 199602 2 001		14/2/2017
Sekretaris : <u>Drs. Suhartono, M.Kes</u> NIP. 19550712 198303 1 001		14/2/2017
Anggota Penguji : <u>Dra. Tritiyatma H., M.Si</u> NIP. 19611225 198701 2 001		13/2/2017
Pembimbing I : <u>Dr. Muktiningsih N., M.Si</u> NIP. 19640511 198903 2 001		14/2/2017
Pembimbing II : <u>Dr. Fera Kurniadewi, M.Si</u> NIP. 19761231 200112 2 002		14/2/2017

Dinyatakan lulus ujian skripsi pada tanggal 9 Februari 2017



بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

LEMBAR PERSEMBAHAN

Dengan rasa syukur yang mendalam skripsi ini kupersembahkan untuk kedua orang tuaku serta kedua adikku yang telah senantiasa memberikan do'a, motivasi serta dukungan kepada diriku.



Terima kasih mama, Sarpiyah atas segala do'a serta cinta yang telah engkau curahkan kepadaku, selalu memberiku dukungan yang tak kenal lelah serta penyemangatku dalam kondisi apapun.



Terima kasih papa, Kwatno atas segala do'a serta motivasi kepadaku dan selalu berusaha memberikan yang terbaik untukku.

Terima kasih adikku, Hannisa Subekti dan Maulidia Husna yang telah membantuku serta penyemangatku dalam menyelesaikan makalah skripsi ini.

Terima Kasih Dr. Muktiningsih Nurjayadi, M.Si selaku dosen pembimbing I dan Dr. Fera Kurniadewi, M.Si selaku dosen pembimbing II dan Kepala Laboratorium Kimia yang telah memberikan ilmunya, membimbing penulis, memberikan dorongan moril serta materi dalam penyelesaian skripsi.

Teman seperjuangan Kimia 2012, Afifah, Aida, Arum, Atih, Baha, Bang Dije, Dian, Dinia, Uwi, Eka, Elfri, Evi, Faniyah, fannisa, Pidey, Ghina, Heni, Inung, Nanda, Novia, Asiah, Ipeh, Oci, Abang Rafi, Alayah, Tanti, Tiap, Vidya, Winda, Yafie, Yuli, Ica, Shirley, Friday, Didi dan Bunga untuk setiap canda, tawa, keluh - kesah, air mata, ilmu serta motivasinya.





Tim Salmonella 2012 & 2013, terima kasih untuk setiap dukungan, kerja sama serta semangat selama melakukan penelitian.

Terima Kasih Winda Sofihan, partner penelitian selama satu tahun penuh. Terima kasih atas segala duka, canda, tawa, keluh - kesah serta air mata selama menjalani penelitian ini. 4.5 tahun sudah kebersamaan kita, semoga kita selalu dalam dekapan ukhuwah ya win ☺.


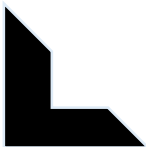
Terima kasih mba Vira Saamia, yang telah mendampingi serta membimbing saya selama menjalani penelitian di Puslabfor.

Terima kasih, rekan - rekan di Subbidang Biologi Molekuler Forensik, Puslabfor, Bareskim Polri : Pak Made, Mba Beta, Mba Rani, Mba Ana, Bu Ii, Pak Sandy dan Pak Irfan atas motivasi, dukungan, do'a serta fasilitas yang telah diberikan selama 5 bulan penelitian. Suatu pengalaman yang sangat berharga bagi saya dapat melakukan penelitian disana.

Terima kasih, Sabar Budiman, atas segala dukungan dan do'a yang telah diberikan serta terima kasih atas setiap waktu yang telah diberikan untukku.

Jakarta, 15 Februari 2017

Dini Nurkhasanah



ABSTRAK

DINI NURKHASANA. Isolasi, Amplifikasi dan Karakterisasi Gen *fim-C* Bakteri *Salmonella typhi* dan *Shigella dysenteriae*. Jakarta: Program Studi Kimia. Jurusan Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam. Universitas Negeri Jakarta. 2017.

Penelitian ini bertujuan untuk mengisolasi DNA bakteri *Salmonella typhi* dan *Shigella dysenteriae* menggunakan *GeneJET Genomic DNA Purification Kit* #K0721, #K0722 (*Thermo Scientific*), amplifikasi gen *fim-C* bakteri *Salmonella typhi* dan *Shigella dysenteriae* dengan metode *Polimerase Chain Reaction* (PCR) dan karakterisasi gen *fim-C* dengan menggunakan elektroforesis gel agarosa 2%. DNA genom bakteri *Salmonella typhi* dan *Shigella dysenteriae* telah berhasil diisolasi dan diperoleh konsentrasi DNA masing – masing sebesar 121.0 ng/μL dan 45.5 ng/μL. DNA genom bakteri *Salmonella typhi* dan *Shigella dysenteriae* masing – masing dilakukan proses amplifikasi terhadap sepasang primer DNA bakteri *Salmonella typhi* dan *Shigella dysenteriae* dari gen *fim-C* dengan metode PCR dan hasil amplifikasi dikarakterisasi menggunakan elektroforesis gel agarosa 2%. Pasangan primer bakteri *Shigella dysenteriae* mampu mengamplifikasi DNA bakteri *Shigella dysenteriae* pada suhu *annealing* 56°C dengan munculnya pita (*band*) pada fragmen ± 95 pb, ± 700 pb dan ± 1000 pb. Pasangan primer bakteri *Salmonella typhi* mampu mengamplifikasi DNA bakteri *Salmonella typhi* pada suhu *annealing* 56°C dengan munculnya pita (*band*) pada fragmen ± 95 pb.

Kata kunci : *Salmonella typhi*, *Shigella dysenteriae*, PCR, *fim-C*

KATA PENGANTAR

Segala puji dan syukur penulis panjatkan atas kehadiran Allah SWT yang telah melimpahkan rahmat dan karunia-Nya, sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul **“Isolasi, Amplifikasi dan Karakterisasi Gen *fim-C* Bakteri *Salmonella typhi* dan *Shigella dysenteriae*”**.

Penyelesaian skripsi ini tidak terlepas dari bimbingan, saran dan dukungan dari berbagai pihak, untuk itu penulis mengucapkan terima kasih kepada Dr. Muktiningsih Nurjayadi, M.Si selaku dosen pembimbing I dan Dr. Fera Kurniadewi, M.Si selaku dosen pembimbing II dan Kepala Laboratorium Kimia yang telah memberikan ilmunya, membimbing penulis, memberikan dorongan moril serta materi dalam penyelesaian skripsi. Penulis juga mengucapkan terima kasih kepada :

1. Vira Saamia S.Si, M.Biomed selaku pembimbing lapangan yang telah mendampingi serta membimbing penulis selama melakukan penelitian di Pusat Laboratorium Forensik, Bareskrim Polri.
2. I Made Wiranatha, S.Si selaku Kepala Subbidang Biologi Molekuler Forensik yang telah memfasilitasi serta membimbing peneliti selama melakukan penelitian di Pusat Laboratorium Forensik, Bareskrim Polri.
3. Dosen – dosen Kimia UNJ yang telah memberikan ilmunya.

Jakarta, Januari 2017

Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
ABSTRAK.....	i
KATA PENGANTAR	ii
DAFTAR ISI.....	iii
DAFTAR GAMBAR.....	v
DAFTAR TABEL.....	vi
DAFTAR LAMPIRAN.....	vii
BAB I PENDAHULUAN.....	1
A. Latar Belakang	1
B. Identifikasi Masalah	4
C. Pembatasan Masalah	4
D. Perumusan Masalah.....	5
E. Tujuan Penelitian.....	5
F. Manfaat Penelitian.....	5
BAB II KAJIAN PUSTAKA	7
A. Bakteri <i>Salmonella typhi</i>	7
B. Bakteri <i>Shigella dysenteriae</i>	9
C. <i>Polymerase Chain Reaction</i> (PCR).....	11
D. Desain Primer.....	14
E. Gen <i>fim-C</i>	17
F. Isolasi DNA Bakteri.....	18
BAB III METODELOGI PENELITIAN	21
A. Tujuan Operasional Penelitian.....	21
B. Tempat dan Waktu Penelitian.....	21
C. Metode Penelitian.....	21
D. Alat dan Bahan.....	22
E. Prosedur Kerja.....	23
E.1. Pembiakan Bakteri <i>Salmonella typhi</i> dan <i>Shigella dysenteriae</i>	23
E.2. Isolasi Genom Bakteri <i>Salmonella typhi</i> dan <i>Shigella dysenteriae</i>	25
E.3. Perancangan Primer Gen <i>fim-C</i> <i>Salmonella typhi</i> dan <i>Shigella dysenteriae</i>	28

E.4. Amplifikasi Pasangan Primer Bakteri <i>Salmonella typhi</i> dan <i>Shigella dysenteriae</i> Menggunakan PCR.....	28
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN.....	30
A. Pembiakan bakteri <i>Salmonella typhi</i> dan <i>Shigella dysenteriae</i>	30
B. Isolasi bakteri <i>Salmonella typhi</i> dan <i>Shigella dysenteriae</i>	33
C. Amplifikasi dan Karakterisasi Pasangan Primer Bakteri <i>Salmonella typhi</i> dan <i>Shigella dysenteriae</i> Menggunakan PCR.....	37
BAB V KESIMPULAN DAN SARAN.....	43
A. Kesimpulan.....	43
B. Saran.....	43
DAFTAR PUSTAKA.....	44
LAMPIRAN	50

DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 1. Bakteri <i>Salmonella typhi</i>	9
Gambar 2. Bakteri <i>Shigella dysenteriae</i>	10
Gambar 3. Tahapan Proses Amplifikasi DNA dengan Menggunakan <i>Polymerase Chain Reaction (PCR)</i>	13
Gambar 4. Struktur Agarosa yang Terdiri dari Unit Agarobios	13
Gambar 5. Visualisasi Hasil Elektroforesis Gel Agarosa	14
Gambar 6. Urutan Nukleotida Gen <i>fim-C Salmonella typhi</i>	17
Gambar 7. Urutan Nukleotida Gen <i>fim-C Shigella dysenteriae</i>	18
Gambar 8. Komponen penyusun DNA	18
Gambar 9. Inokulum Bakteri <i>Salmonella typhi</i> dan <i>Shigella dysenteriae</i> dalam Media Luria Broth	31
Gambar 10. Koloni Tak Berwarna Bakteri <i>Shigella dysenteriae</i>	32
Gambar 11. Koloni Hitam Bakteri <i>Salmonella typhi</i>	32
Gambar 12. Hasil Elektroforesis DNA Genom Bakteri <i>Salmonella typhi</i> dan <i>Shigella dysenteriae</i>	36
Gambar 13. Hasil Amplifikasi Primer <i>Salmonella typhi</i>	40
Gambar 14. Hasil Amplifikasi Primer <i>Shigella dysenteriae</i>	40

DAFTAR TABEL

Halaman

Tabel 1. Hasil Pengukuran Kemurnian dan Konsentrasi Hasil Isolasi DNA 35

Tabel 2. Pasangan Primer Bakteri *Salmonella typhi* dan *Shigella dysenteriae* . 38

DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
Lampiran 1. Bagan Kerja	51
Lampiran 2. Genom Bakteri <i>Salmonella typhi</i>	57
Lampiran 3. Genom Bakteri <i>Shigella dysenteriae</i>	60

BAB I

PENDAHULUAN

A. Latar Belakang

Makanan merupakan kebutuhan dasar untuk kelangsungan hidup manusia. Makanan mengandung zat yang dibutuhkan manusia dalam kehidupan setiap hari. Makanan harus murni dan utuh dalam arti tidak mengandung bahan pencemar serta harus higienis. Bila salah satu faktor tersebut terganggu maka makanan yang dihasilkan akan menimbulkan gangguan kesehatan dan penyakit bahkan keracunan makanan.

Keracunan makanan (*foodborne disease*) ditetapkan oleh Organisasi Kesehatan Dunia (WHO) sebagai penyakit, umumnya *foodborne disease* dapat menular akibat mengonsumsi makanan yang mengandung bahan berbahaya atau toksik dan bakteri (*Food Standards Agency*, 2011). Keracunan makanan yang disebabkan oleh bakteri merupakan masalah yang global dan serius. WHO memperkirakan penyakit keracunan makanan dan diare dapat ditularkan melalui air dan dapat membunuh sekitar 2,2 juta orang per tahun (*Food Standards Agency*, 2011).

Badan POM menyatakan pada bulan Juli sampai dengan September 2016 terdapat 26 insiden keracunan yang terjadi di berbagai wilayah Indonesia. Insiden keracunan tersebut didominasi oleh keracunan pangan. Sebanyak 25 insiden keracunan disebabkan oleh makanan dan minuman, 1 insiden keracunan akibat racun alam. Insiden keracunan pangan yang diperoleh mencakup 9 insiden keracunan disebabkan oleh makanan olahan

rumah tangga dengan total korban 490 orang dan dua diantaranya meninggal dunia; 8 insiden keracunan karena makanan olahan jasa boga dengan total korban 316 orang, 3 insiden keracunan karena makanan olahan jajanan (PKL) dengan total korban 29 orang, 2 insiden keracunan karena makanan olahan dalam kemasan dengan total korban 20 orang serta 2 insiden keracunan karena minuman dalam kemasan dengan total korban dua orang serta campuran antara makanan dan minuman sebanyak 1 insiden keracunan dengan korban tujuh orang (BPOM, 2016).

Penelitian yang dilakukan oleh Velusamy *et al.*, 2010 menunjukkan terdapat beberapa bakteri patogen penyebab keracunan makanan (*foodborne pathogens*) yang berhasil diidentifikasi, diantaranya adalah bakteri *Salmonella enterica species*, *Campylobacter jejuni*, *Clostridium botulinum*, *Vibrio species*, *Shigella*, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus* dan *Escherichia coli*. Metode laboratorium yang cepat dan sensitif sangat diperlukan untuk mendeteksi bakteri patogen penyebab keracunan makanan (*foodborne pathogens*).

Pengembangan metode deteksi *foodborne pathogens* mulai dikembangkan untuk mengatasi kekurangan metode tradisional yaitu waktu yang dibutuhkan untuk mendeteksi bakteri *foodborne pathogen* diperlukan kurang lebih 4 – 6 hari (Malorny, 2013). Adapun metode yang dikembangkan saat ini tidak lagi berbasis pada tingkat sel, tetapi sudah mulai pada tingkat molekular yang meliputi deteksi berbasis tingkat genomik

(*nucleic-based-methods*) diantaranya adalah metode *Polymerase Chain Reaction* (PCR) (Fei Law *et al.*, 2015).

Metode *Polymerase Chain Reaction* (PCR) merupakan salah satu alternatif untuk mendeteksi keberadaan *foodborne pathogens*. Prinsip metode *Polymerase Chain Reaction* (PCR) didasarkan pada amplifikasi fragmen DNA dimana terjadi penggandaan jumlah molekul DNA pada setiap siklusnya secara eksponensial dalam waktu yang relatif singkat. Sehingga metode ini dianggap lebih cepat, spesifik, dan sensitif (Muktiningsih *et al*, 2015).

Penelitian sebelumnya telah menemukan pasangan primer *fim-C* [Fw-int2-Rev 1a new] pada daerah variable *Salmonella typhi* yang telah berhasil mengamplifikasi sebagian fragmen gen *fim-C* berukuran 0.2 Kb dengan menggunakan metode *Polymerase Chain Reaction* (PCR) oleh Muktiningsih *et al*, 2010. Protein Fim-C berfungsi sebagai alat untuk melekatkan diri pada usus manusia dan terletak pada bagian permukaan (Muktiningsih *et al*, 2015). Berdasarkan keberadaannya tersebut maka protein ini sangat potensial dijadikan target dalam merancang alat deteksi pada tingkat genomik dengan metode *Polymerase Chain Reaction* (PCR).

Penelitian ini merupakan bagian payung penelitian besar Tim *Salmonella* UNJ yang mengkaji tentang model pengembangan metode deteksi pada tingkat genomik. Berdasarkan hasil dan pengalaman penelitian yang dilakukan maka Tim *Salmonella* UNJ berusaha mengembangkan metode deteksi baru dengan memanfaatkan metode

Polymerase Chain Reaction (PCR) untuk mendeteksi bakteri *Salmonella* spesies dan bakteri penyebab keracunan makanan dari biakan murni.

B. Identifikasi Masalah

Berdasarkan latar belakang yang telah dipaparkan, penulis dapat mengidentifikasi beberapa permasalahan sebagai berikut:

1. Bagaimana isolasi DNA genom bakteri *Salmonella typhi* dan *Shigella dysenteriae* dari biakan murni?
2. Dapatkah pasangan primer gen *fim-C* bakteri *Salmonella typhi* dan *Shigella dysenteriae* mengamplifikasi DNA *template* bakteri *Salmonella typhi* dan *Shigella* dengan menggunakan metode *Polymerase Chain Reaction* (PCR)?
3. Bagaimana hasil karakterisasi amplifikasi pasangan primer gen *fim-C* bakteri *Salmonella typhi* dan *Shigella dysenteriae* menggunakan elektroforesis gel agarosa berdasarkan pola pita DNA?

C. Pembatasan Masalah

Permasalahan penelitian akan dibatasi pada isolasi DNA genom bakteri *Salmonella typhi* dan *Shigella dysenteriae*, amplifikasi pasangan primer gen *fim-C* bakteri *Salmonella typhi* dan *Shigella dysenteriae* menggunakan metode *Polymerase Chain Reaction* (PCR) dan karakterisasi hasil amplifikasi pasangan primer gen *fim-C* bakteri *Salmonella typhi* dan *Shigella dysenteriae* menggunakan elektroforesis gel agarosa berdasarkan pola pita DNA.

D. Perumusan Masalah

Perumusan masalah pada penelitian ini sebagai berikut :

1. Bagaimana hasil isolasi DNA genom bakteri *Salmonella typhi* dan *Shigella dysenteriae*?
2. Bagaimana kemampuan pasangan primer gen *fim-C* bakteri *Salmonella typhi* dan *Shigella dysenteriae* dalam mengamplifikasi DNA *template* menggunakan metode *Polymerase Chain Reaction* (PCR)?
3. Bagaimana hasil karakterisasi amplifikasi pasangan primer gen *fim-C* bakteri *Salmonella typhi* dan *Shigella dysenteriae* menggunakan elektroforesis gel agarosa berdasarkan pola pita DNA?"

E. Tujuan Penelitian

Penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan informasi tentang cara mengisolasi genom DNA bakteri *Salmonella typhi* dan *Shigella dysenteriae*, amplifikasi pasangan primer gen *fim-C* bakteri *Salmonella typhi* dan *Shigella dysenteriae* menggunakan metode *Polymerase Chain Reaction* (PCR) dan mengetahui hasil karakterisasi amplifikasi pasangan primer gen *fim-C* bakteri *Salmonella typhi* dan *Shigella dysenteriae* menggunakan elektroforesis gel agarosa berdasarkan pola pita DNA.

F. Manfaat Penelitian

Penelitian ini diharapkan dapat menjadi sumber referensi bagi khalayak umum mengenai cara mengisolasi genom DNA bakteri

Salmonella typhi dan *Shigella dysenteriae* serta menjadikan penelitian ini sebagai penunjang studi dalam pengembangan *Polymerase Chain Reaction* (PCR) dalam mendeteksi bakteri penyebab keracunan makanan dari biakan murni.

BAB II

KAJIAN PUSTAKA

A. Bakteri *Salmonella typhi*

Genus bakteri *Salmonella* dibagi menjadi dua spesies, yaitu *Salmonella bongori* dan *Salmonella enterica*. *Salmonella enterica* sendiri dibagi menjadi enam subspecies, diantaranya *S. enterica subsp. enterica*, *S. enterica subsp. salamae*, *S. enterica subsp. arizonae*, *S. enterica subsp. diarizonae*, *S. enterica subsp. indica*, and *S. enterica subsp. houtenae* (Porwollik *et al.*, 2004).

Bakteri *Salmonella enterica* adalah bakteri *foodborne pathogen* yang dapat menyebabkan penyakit gastroenteritis dan infeksi sistemik pada manusia dan hewan. Tercatat lebih dari 93.800.000 kasus pada manusia dan sekitar 155.000 kematian setiap tahunnya di seluruh dunia yang disebabkan oleh bakteri *Salmonella* (Malorny, 2013).

Taksonomi dari bakteri *Salmonella typhi* adalah sebagai berikut :

Kingdom	: Bacteria
Filum	: Proteobacteria
Kelas	: Gamma Proteobacteria
Ordo	: Eurobacteriales
Famili	: Enterobacteriaceae
Genus	: <i>Salmonella</i>
Spesies	: <i>Salmonella enterica</i>
Serotipe	: <i>Typhi</i>

Salmonella enterica merupakan bakteri Gram–negatif, berbentuk batang dengan ukuran 0,4 – 0,8 μm , memiliki panjang 2 – 5 μm , dan memiliki flagel. *Salmonella enterica* memiliki jumlah *serovar* atau *strain* yang besar. Subspesies biomedis yang paling relevan disebut *Salmonella enterica* spp *enterica*, yang salah satu subspesiesnya adalah *enterica Typhi* (Fabrega dan Vila, 2013 ; Setianingsih, 2015).

Salmonella – Shigella Agar (SSA) merupakan salah satu media padat selektif yang dapat mengidentifikasi bakteri *Salmonella* spp. Koloni bakteri *Salmonella* spp. dalam media *Salmonella – Shigella* Agar ditunjukkan dengan terbentuknya koloni berwarna hitam diatas permukaan media. Endapan hitam ditengah koloni terbentuk akibat reaksi gas H_2S dengan ion besi hingga menghasilkan endapan hitam FeS . Gas H_2S yang dihasilkan akibat reduksi natrium tiosulfat oleh enzim tiosulfat reduktase. (Himedia, 2011 ; Acumedia, 2011).



Gambar 1. Bakteri *Salmonella typhi*. Bakteri *Salmonella typhi* merupakan bakteri penyebab penyakit demam tifoid pada manusia (Todar, 2012).

Bakteri *Salmonella typhi* merupakan bakteri patogen penyebab demam tifoid pada manusia (*typhoidal serovars*). Demam tifoid merupakan penyakit endemik di Indonesia yang menyerang manusia mulai dari usia balita, anak-anak hingga dewasa. Penderita demam tifoid umumnya akan mengalami demam dengan suhu tubuh mencapai 39 – 40°C. Selain mengalami demam, penderita juga akan mengalami gejala lainnya termasuk menggigil, nyeri perut, ruam pada kulit (bintik - bintik), mual, diare, sakit kepala, dan batuk kering. Gejala demam tifoid akan terlihat setelah 72 jam masuknya bakteri *Salmonella typhi* ke dalam tubuh (*Host*) (Dougan dan Baker, 2014 ; Gal-Mor *et al.*, 2014 ; Public Health Agency of Canada, 2010).

B. Bakteri *Shigella dysenteriae*

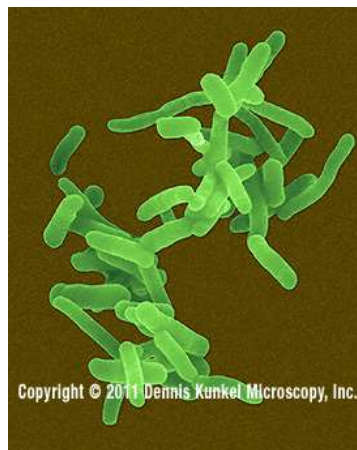
Genus bakteri *Shigella* merupakan bakteri Gram–negatif. Genus *Shigella* diklasifikasi menjadi empat serogroup, yaitu Serogroup A : *Shigella dysenteriae* , Serogroup B : *Shigella flexneri*, Serogroup C : *Shigella boydii*, dan Serogroup D : *Shigella sonnei* (WHO, 2005).

Taksonomi dari *Shigella dysenteriae* adalah :

Kingdom : Bacteria
 Filum : Proteobacteria
 Kelas : Gammaproteobacteria
 Ordo : Enterobacteriales
 Famili : *Enterobacteriaceae*
 Genus : *Shigella*
 Spesies : *Shigella dysenteriae*

Shigella dysenteriae merupakan bakteri Gram–negatif yang berbentuk basil, non-motil, tidak memiliki flagel, tidak berkapsul, dan *Shigella*

dysenteriae dapat tumbuh subur pada suhu 37°C. Ukuran *Shigella dysenteriae* sekitar 2 – 3 µm x 0,5 – 0,7 µm dan susunannya tidak teratur. Koloni *Shigella dysenteriae* berbentuk bulat, transparan dengan pinggir utuh dan berukuran mencapai 2 mm. *Salmonella – Shigella* Agar (SSA) merupakan salah satu media padat selektif yang dapat mengidentifikasi bakteri *Shigella* spp. Bakteri *Shigella* spp. dalam media *Salmonella – Shigella* Agar ditunjukkan dengan terbentuknya dengan koloni tidak berwarna diatas permukaan media (Acumedia, 2011 ; Baron, 1996 ; Himedia, 2011).



Gambar 2. Bakteri *Shigella dysenteriae*. Bakteri *Shigella dysenteriae* merupakan bakteri penyebab penyakit shigellosis (Kunkel, 2001.).

Bakteri *Shigella dysenteriae* merupakan bakteri patogen yang menyebabkan penyakit shigellosis. Penyakit shigellosis dapat menyerang manusia mulai dari usia balita, anak - anak hingga dewasa. Manusia yang terinfeksi bakteri *Shigella dysenteriae* akan mengalami gejala diare, demam dan kram perut. Gejala tersebut dapat dirasakan satu atau dua hari setelah *host* mengkonsumsi makanan atau minuman yang terkontaminasi bakteri

Shigella dysenteriae. Manusia merupakan reservoir utama dari bakteri *Shigella dysenteriae*. Negara-negara dengan kondisi sanitasi yang tidak memadai sangat rentan akan terinfeksi bakteri *Shigella dysenteriae*. Bakteri *Shigella dysenteriae* sangat mudah ditularkan melalui kotoran manusia. Lalat dapat berkontribusi untuk menyebarkan bakteri *Shigella dysenteriae* dari feses ke makanan. Spesies *Shigella dysenteriae* dan *Shigella flexneri* merupakan spesies yang paling virulen (Baron, 1996 ; Todar, 2012 ; Schroeder dan Hilbi, 2008).

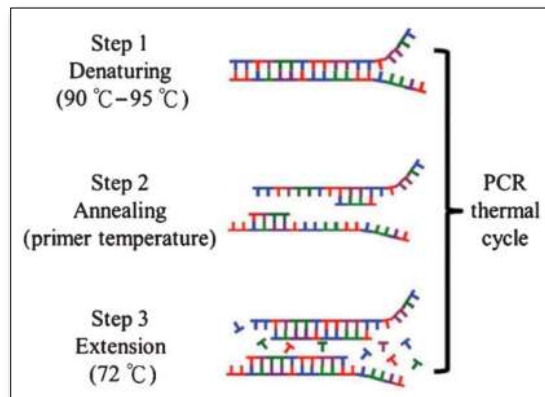
C. Polymerase Chain Reaction (PCR)

Polymerase Chain Reaction (PCR) merupakan metode sintesis secara *in vitro* untuk memperbanyak satu atau lebih suatu fragmen DNA hingga menghasilkan ribuan atau jutaan salinan fragmen DNA. Metode ini dikembangkan pada tahun 1984 oleh Kary Mullis. Umumnya proses PCR berlangsung sebanyak 30 - 35 siklus. (Joshi dan J.D. Deshpande, 2010 ; Handoyo dan Rudiretna, 2001 ; Chang *et al.*, 2013).

Proses PCR diperlukan beberapa komponen, yaitu 1) Pasangan primer, merupakan suatu sekuen oligonukleotida pendek yang komplemen dengan *template* DNA dan berfungsi sebagai pembatas fragmen DNA target yang akan di amplifikasi dan memiliki kandungan G+C% sebesar 50 – 60% ; 2) *Template* DNA, merupakan suatu polinukleotida yang mengandung suatu fragmen DNA yang akan di amplifikasi ; 3) Enzim DNA *Taq polymerase*, merupakan sebuah katalis pada reaksi polimerisasi DNA ; 4) *Deoxynucleoside triphosphates* (dNTPs) merupakan *building blocks*

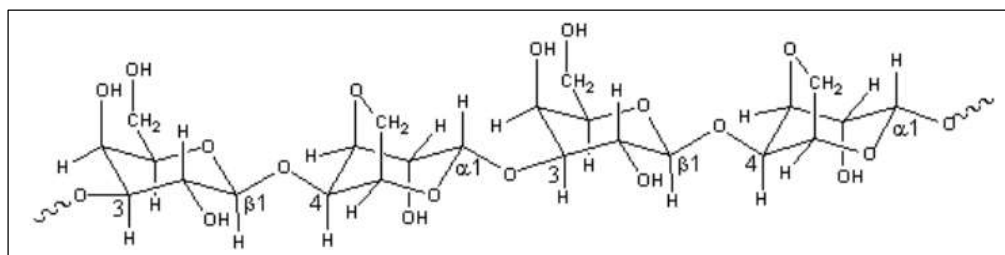
yang diperlukan enzim DNA *polymerase* dalam menyintesis untai DNA baru ; 5) Larutan Buffer, digunakan untuk mengatur kondisi DNA *polymerase* agar dapat bekerja secara optimal ; 6) Kation Mg^{2+} yang berfungsi sebagai kofaktor enzim DNA *polymerase* (Handoyo dan Rudiretna, 2001 ; Yusuf, 2010).

Proses PCR terdiri dari tiga siklus, yaitu 1) *Denaturation*, DNA dengan untai *double stranded* akan di denaturasi menjadi *single stranded* pada suhu $90^{\circ}C$ - $95^{\circ}C$. Suhu denaturasi yang terlalu tinggi akan mempengaruhi aktivitas enzim DNA *polymerase* dan akan berdampak pada produk akhir PCR, sedangkan jika suhu denaturasi yang digunakan terlalu rendah akan menyebabkan denaturasi DNA *template* menjadi tidak sempurna ; 2) *Annealing*, merupakan suatu tahap penempelan pasangan primer pada untai *single stranded* DNA. Umumnya suhu annealing yang digunakan adalah $55^{\circ}C$ - $75^{\circ}C$; (3) *Extension*, pada proses ekstensi dibutuhkan enzim DNA *Taq polymerase* untuk pembentukan untai DNA baru. Umumnya suhu ekstensi yang digunakan adalah $70^{\circ}C$ - $75^{\circ}C$ (Handoyo dan Rudiretna, 2001 ; Chang *et al.*, 2013 ; Fei-Law *et al.*, 2015 ; Gerstein, 2001). Proses amplifikasi DNA dengan menggunakan PCR ditunjukkan pada gambar 3.



Gambar 3. Tahapan Proses Amplifikasi DNA dengan Menggunakan *Polymerase Chain Reaction* (PCR) (Chang *et al.*, 2013).

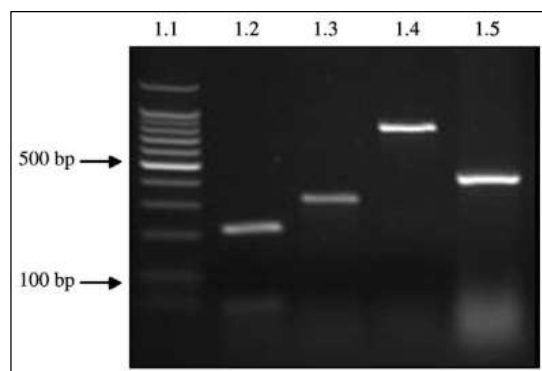
Larutan hasil PCR dapat di karakterisasi dengan metode elektroforesis gel agarosa. Elektroforesis gel agarosa merupakan teknik yang digunakan untuk memisahkan fragmen DNA berdasarkan ukurannya. Agarosa merupakan hasil isolasi dari rumput laut *Gelidium* dan *Gracilaria* yang tersusun atas agarobios. Agarobios merupakan disakarida yang tersusun atas β -D-galaktosa dan 3,6-anhidro- α -L-galaktosa (Fu dan Kim, 2010 ; Langga *et al*, 2012). Struktur agarosa ditunjukkan pada gambar 4.



Gambar 4. Struktur Agarosa yang Terdiri dari Unit Agarobios (Fu dan Kim, 2010).

Prinsip dasar teknik ini adalah bahwa DNA dapat dipisahkan oleh medan listrik dalam kondisi konstan berdasarkan ukurannya oleh gaya gerak listrik di dalam matriks gel. Sampel ditempatkan dalam sumur gel

(*well*) yang berisi larutan penyangga TAE (buffer Tris Asetat EDTA) dengan arus yang sudah ditentukan. Molekul DNA yang memiliki muatan negatif ditempatkan dalam katoda, ketika dialiri suatu arus listrik molekul DNA yang ditempatkan dalam katoda akan bermigrasi ke anoda yang bermuatan positif. DNA memiliki ukuran yang beragam sehingga molekul DNA dapat dipisahkan berdasarkan ukuran dalam gel agarosa dalam pola tertentu. Proses visualisasi molekul DNA dibantu oleh proses pewarnaan dengan penambahan larutan etidium bromida (EtBr) (Lee *et al.*, 2012). Setelah proses elektroforesis, gel agarosa disinari oleh sinar ultra violet agar hasil amplifikasi PCR berupa pita (*band*) yang terbentuk dapat terlihat. Hasil elektroforesis ditunjukkan pada gambar 5.



Gambar 5. Visualisasi Hasil Elektroforesis Gel Agarosa. 1.1) DNA Ladder 1 Kb, 1.2 – 1.5) DNA hasil amplifikasi (Freitas *et al.*, 2010).

D. Desain Primer

Primer merupakan suatu sekuen oligonukleotida pendek yang komplemen dengan DNA *template* dan berfungsi sebagai pembatas fragmen DNA target yang akan di amplifikasi. Pasangan primer terdiri dari *forward* primer dan *reverse* primer. Perancangan pasangan primer dapat

dilakukan berdasarkan urutan DNA yang telah ditentukan. Hal – hal yang harus diperhatikan dalam penentuan kriteria perancangan pasangan primer adalah sebagai berikut (Handoyo dan Rudiretna, 2001; D.G. Pradnyaniti et al, 2013) :

A. Panjang primer

Umumnya panjang primer berkisar 18 – 30 basa. Primer dengan panjang yang kurang dari 18 basa akan menyebabkan spesifisitas primer menjadi rendah dan dapat memungkinkan terjadinya *mispriming* (penempelan primer di tempat yang tidak diinginkan), sedangkan panjang primer yang lebih dari 30 basa akan meningkatkan spesifisitas primer secara bermakna.

B. *Melting Temperature* (T_m)

Melting temperature (T_m) merupakan suhu dimana separuh untai ganda DNA terpisah. Umumnya T_m yang digunakan berkisar 50 - 65°C.

C. Komposisi G + C

Komposisi G + C merupakan banyaknya guanin dan sitosin dalam suatu primer, sebaiknya komposisi G + C berada pada rentang 40 - 60%. Primer dengan komposisi G + C yang rendah dapat menurunkan efisiensi proses PCR sehingga primer tidak mampu berkompetisi untuk menempel secara efektif pada DNA *template*.

D. GC clamp

GC clamp merupakan jumlah basa G dan C yang terdapat pada 5 basa terakhir. Komposisi GC clamp ada ujung 3' sebaiknya tidak lebih dari 3 basa G atau C karena dapat menurunkan spesifisitas primer dan sangat membantu terjadinya stabilitas ikatan antara primer dengan DNA *template* yang diperlukan untuk inisiasi *polymerase* DNA pada proses PCR.

E. Primer Secondary Structures

- i. *Hairpins*, interaksi intramolekuler dalam primer. Hairpins dalam primer dapat mengganggu proses penempelan primer pada DNA *template* dalam proses PCR.
- ii. *Self dimer*, ikatan yang terbentuk antar primer sejenis baik antar *forward – forward* maupun *reverse – reverse*.
- iii. *Cross dimer*, ikatan yang terbentuk antar pasangan primer yaitu ikatan antar *forward* dan *reverse*.

F. Repeats

Primer sebaiknya tidak memiliki urutan pengulangan dari 2 basa dan maksimum pengulangan 2 basa sebanyak 4 kali masih dapat di toleransi. Contoh : GCGCGCGC.

G. Run

Penentuan *run* dilakukan dengan menghitung jumlah pengulangan basa sejenis dalam primer dengan ketentuan pengulangan tidak boleh lebih dari 5 basa. Contoh : CCCCCC.

E. Gen *fim-C*

Gen merupakan bagian fungsional dari DNA yang menentukan suatu sifat tertentu pada makhluk hidup. Gen *fim-C* merupakan gen yang mengkode protein *fimbrial* dengan ukuran 25 – 26 kDa. Gen *fim-C* termasuk pada gen *fimbrial* tipe 1 dengan ukuran diameter 7 – 8 nm dan panjang 100 nm yang terletak pada bagian pili atau fimbriae dipermukaan sel bakteri. Pili atau fimbriae adalah filamen yang dimiliki oleh sebagian besar bakteri Gram–negatif yang terletak di permukaan sel tubuh bakteri. Gen *fim-C* tersusun atas struktur polimer protein yang berulang melalui ikatan non kovalen dan subunit protein. Gen *fim-C* berfungsi sebagai mediator penting terhadap interaksi bakteri dengan sel inang serta invasi sel epitel pada sel inang (Wray dan Wray, 2000 dan Drahovská *et al.*, 2001). *Complete genome* bakteri *Salmonella typhi* dan *Shigella dysenteriae* ditunjukkan pada lampiran 2 dan 3. Urutan gen *fim-C* bakteri *Salmonella typhi* dan *Shigella dysenteriae* ditunjukkan pada gambar 6 dan 7.

ORIGIN					
1	atgctgaata	gtataaaatt	aggattttatt	gttotttctca	cgttatttac
61	gtacagggcg	cgggggggat	tgcatttaggc	gccacgcgtg	ttatttatcc
121	aaacagactt	ctctggcaat	cagtaatagc	gataactcaag	aacgttacct
181	tggatogaaa	ataacgctgg	gcagaaagaa	aaaacgttta	tcgttacgcc
241	gtcagcgagc	ccaaaagtga	aaacacgctg	cgtattatct	acgcogggca
301	gaggatcggg	agtcgttatt	ctggatgaac	gtgaaagcca	tcccgtcggt
361	catattgaag	gaaaaaacgt	tctgcaactg	gcgattctgt	cgcgcaccaa
421	cgtccggcga	atttgccgca	gacgcgggaa	gacgcgccga	ccttgctgaa
481	gtcggcaacc	atctcaagat	aaccaaccca	tctgcttatt	acctoacgct
541	agcgtgggtg	cgaaaaagat	tgataacgtg	atgatcgcg	caaaaagcga
601	cccttaccga	ctggcgcgca	gggcagcgtg	acatttcaga	ccgtcaatga
661	ttgacgtcgg	cgacaacagc	cagtctcggt	taa	

Gambar 6. Urutan Nukleotida Gen *fim-C* *Salmonella typhi*. Gen *fim-C* *Salmonella typhi* berukuran 693 bp berada pada urutan 597283 – 597975 dari *complete genome* (NCBI, 2016).

ORIGIN

```

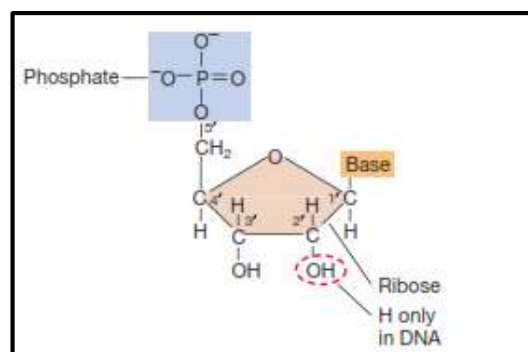
1 atggccttta gggttctgac catggcggta gacctgtgca gactgacaac gaggacaatg
61 aatgttaacg ctggccatga aagaacctca aaatcccgcg ttatacatca gattcaacta
121 attagaggca tcaccgaaaa tgaaaaggga gagaaaagcg atgaatttct cgtcgcctg
181 ccgcctatcc agcgactgga gccaaaagcg acttcgcagg ttcggatcat gaaacaagcc
241 gccaccgcga aagtaccacac cgatcgcgaa tctctctttt actataacct gcgtgaaatt
301 ccgcctgtcc cggaaggcag cgagggccat gcgatcctgc aagtcgcgt ccaaagtcgc
361 attaagctat tctggcggcc cgccgcatta cgcaaaaaaa tgggcgatca tgttgagcaa
421 cagctacagg ttagccagca gaataaccag cttaccctga aaaaccgcac cggatactat
481 ctgactattg cctatcttgg gcgggatgag aaaggcgtgc tgcctggctt taaaagcacg
541 atggtcgcac cgttcagttc ggtcaccacc agcacgggca gctatagcgg caagcagttt
601 tatcttggtt acatggacga ctacggcgca ttgcgtatga acacgctctc ctgccagcgg
661 caatgccgcc tgcagccggt ggagaataaa aaatga

```

Gambar 7. Urutan Nukleotida Gen *fim-C Shigella dysenteriae*. Gen *fim-C Shigella dysenteriae* berukuran 696 bp berada pada urutan 614951 – 615646 dari *complete genome* (NCBI, 2016).

F. Isolasi DNA Bakteri

DNA merupakan material genetik yang memiliki fungsi sebagai pembawa sifat pada makhluk hidup. DNA memiliki struktur pilinan utas ganda yang tersusun atas molekul gula pentosa (deoksiribosa), gugus fosfat, dan basa nitrogen. Basa nitrogen pada DNA terdiri atas dua macam, yaitu basa purin dan pirimidin. Basa purin terdiri atas Adenin (A) dan Guanin (G) yang memiliki struktur cincin ganda, sedangkan basa pirimidin terdiri atas Sitosin (C) dan Timin (T) yang memiliki struktur cincin tunggal (Faatih, 2009).



Gambar 8. Komponen penyusun DNA. Tersusun atas gula deoksiribosa, gugus fosfat dan basa nitrogen (Madigan *et al*, 2011).

Isolasi DNA bakteri merupakan tahap awal yang harus dikerjakan dalam proses rekayasa genetika sebelum melangkah ke proses selanjutnya. Dalam melakukan isolasi DNA bakteri, terdapat dua prinsip, yaitu prinsip sentrifugasi dan presipitasi. Prinsip sentrifugasi adalah memisahkan substansi berdasarkan berat jenis molekul dengan cara memberikan gaya sentrifugal sehingga substansi yang lebih berat akan berada di dasar, sedangkan substansi yang lebih ringan akan terletak di atas. Prinsip presipitasi adalah pengendapan yang dilakukan untuk memisahkan DNA dari zat - zat lainnya (Faatih, 2009).

Tahap pertama dalam isolasi DNA adalah proses pemecahan membran dan dinding sel. Pemecahan sel (lisis) merupakan tahapan awal dari proses isolasi DNA yang bertujuan untuk mengeluarkan isi sel bakteri. Penghancuran membran dan dinding sel dapat dilakukan secara kimiawi dengan larutan detergen yang dapat melarutkan lipid pada membran sel sehingga terjadi destabilisasi membran sel. Penggunaan fenol sebagai pendenaturasi protein yang menyebabkan protein kehilangan kelarutannya dan mengalami presipitasi yang selanjutnya dapat dipisahkan dari DNA melalui sentrifugasi. Selain fenol, dapat pula digunakan campuran fenol dan kloroform atau campuran fenol, kloroform, dan isoamil alkohol untuk mendenaturasi protein. Ekstrak DNA yang didapat seringkali terkontaminasi oleh RNA sehingga RNA dapat dipisahkan dari DNA ekstrak dengan cara pemberian enzim *RNAse A*.

Proses presipitasi dilakukan dengan penambahan etanol atau isopropanol bertujuan untuk menghilangkan residu - residu garam yang masih tersisa. Garam - garam yang terlibat dalam proses ekstraksi bersifat kurang larut dalam isopropanol sehingga dapat terpresipitasi bersama DNA, oleh sebab itu dibutuhkan presipitasi kembali dengan etanol atau isopropanol untuk menghilangkan residu garam. Setelah pellet DNA dikeringanginkan, tahap selanjutnya adalah penambahan buffer TE ke dalam tabung yang berisi pellet dan kemudian disimpan di dalam freezer dengan suhu sekitar -20°C (Irawan, 2014).

BAB III

METODELOGI PENELITIAN

A. Tujuan Operasional Penelitian

1. Menghasilkan genom DNA bakteri untuk digunakan sebagai DNA *template*.
2. Menghasilkan rancangan pasangan primer gen *fim-C* yang bersifat komplemen dengan DNA *template*.
3. Mengetahui karakterisasi hasil amplifikasi pasangan primer gen *fim-C* bakteri *Salmonella typhi* dan *Shigella dysenteriae* menggunakan elektroforesis gel agarosa.

B. Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian akan dilakukan di Laboratorium Biokimia dan Bioteknologi Jurusan Kimia FMIPA UNJ dan Lembaga Mitra Pusat Laboratorium Forensik MABES POLRI. Waktu penelitian akan berlangsung dari bulan Februari 2016 – Januari 2017.

C. Metode Penelitian

Metode penelitian yang dilakukan adalah metode penelitian eksperimental, yang meliputi:

1. Pemiakan bakteri *Salmonella typhi* dan *Shigella dysenteriae* dari biakan murni.
2. Isolasi genom bakteri *Salmonella typhi* dan *Shigella dysenteriae* dari biakan murni.

3. Perancangan pasangan primer gen *fim-C* bakteri *Salmonella typhi* dan *Shigella dysenteriae* untuk proses *Polymerase Chain Reaction* PCR.
4. Amplifikasi pasangan primer dan Karakterisasi hasil isolasi *Polymerase Chain Reaction* PCR.

D. Alat dan Bahan

1. Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah autoklaf (All American), nano drop (Mastro Nano), tabung mikrotube 1,5 mL dan 100 μ L (Extragene), mikrosentrifuge (Sorval Legend Micro 17R), pipet mikro 0,2-20 μ L, 0,5-10 μ L, 10-100 μ L, dan 100-1000 μ L (BioRad) dengan tip steril, Shaking Water bath (Stuart SDS40), inkubator (Memmert), *Water Bath* (Memmert), *Laminar Airflow* (Esco), *Vortex Mixer* (Maxi Mix II), Spektrofotometer UV-Vis (Genesys), kulkas (Sharp), freezer (Sharp), alat, *Hotplate* (Stuart), satu set alat elektroforesis (BioRad), kertas parafilm, UV transluminator (BDA Digital), satu set alat elektroforesis DNA (Mupid Ex), *Polymerase Chain Reaction* (PCR) (Applied Biosystems), jarum ose steril, pemanas bunsen, alat-alat kaca (*Pyrex*), dan alat dokumentasi (Samsung).

2. Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah bakteri-bakteri dalam medium padat miring yang diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi UI yaitu bakteri *Salmonella typhi* dan *Shigella dysenteriae*.

Selanjutnya bakteri-bakteri tersebut dibiakkan dan diremajakan di Laboratorium Biokimia FMIPA UNJ sebagai bakteri uji, medium cair *Luria Broth*, medium padat *Salmonella Shigella* Agar dan Nutrient Agar, *GeneJET Genomic DNA Purification Kit* (*Digestion Solution*, *Proteinase K*, *RNAse Solution*, *Lysis Solution*, Etanol 50%, *Wash Buffer I*, *Wash Buffer II* dan *Elution Buffer*) (*Thermo Scientific*), etanol 70%, pasangan primer gen *fim-C* bakteri *Salmonella typhi* dan *Shigella dysenteriae* hasil sintesis, kit PCR (*Master Mix* dan *Nuclei Free Water*) (*Thermo Scientific*), Agarosa (*Promega*), *Loading Dye* 6x (*Promega*), Buffer TAE 1x (*Tris-acetat-EDTA*) (*Thermo Scientific*), etidium bromida 0,1% (*Promega*), DNA ladder 1 kb (*Thermo Scientific*), DNA ladder 100 bp (*Thermo Scientific*), desinfektan (*Wipol*) dan tissue bersih.

E. Prosedur Kerja

E.1. Pembiakan Bakteri *Salmonella typhi* dan *Shigella dysenteriae*

Bakteri biakan dalam medium padat miring diperoleh dari laboratorium Mikrobiologi UI yaitu bakteri *Salmonella typhi* dan *Shigella dysenteriae*. Selanjutnya bakteri-bakteri tersebut dibiakkan di Laboratorium Biokimia-Bioteknologi FMIPA UNJ sebagai bakteri uji. Semua proses pembiakan dilakukan didalam *laminar airflow* untuk mencegah kontaminasi mikroorganisme lain.

E.1.3. Pembiakkan Bakteri *Salmonella typhi* dan *Shigella dysenteriae* pada Media Luria Broth (LB)

Biakan bakteri *Salmonella typhi* dan *Shigella dysenteriae* dalam gliserol stock diambil dengan jarum ose steril, lalu dicelupkan

kedalam 5 mL medium Luria Broth steril. Kemudian dilakukan inkubasi pada suhu 37°C selama 16 - 18 jam (*overnight culture*). Hasil biakan bakteri diidentifikasi setelah masa inkubasi tersebut. Timbulnya kekeruhan pada media menunjukkan bahwa bakteri telah tumbuh dengan baik.

E.1.3. Pembiakan Bakteri *Salmonella typhi* dan *Shigella dysenteriae* pada Media Selektif Salmonella - Shigella Agar (SSA)

Medium selektif yang digunakan adalah medium SSA. Pertama - tama biakan bakteri *Salmonella typhi* dan *Shigella dysenteriae* dari media cair Luria Broth diinokulasi dengan jarum ose steril, lalu digoreskan secara zig - zag (*streak plate method*) pada medium agar SSA dalam cawan petri yang telah disterilisasi. Setelah itu diinkubasi pada suhu 37°C selama 16 - 18 jam (*overnight culture*). Hasil biakan bakteri diperiksa setelah waktu inkubasi tersebut. Munculnya koloni berwarna hitam merupakan indikator bahwa bakteri yang tumbuh adalah benar-benar bakteri *Salmonella typhi* dan munculnya koloni tak berwarna merupakan indikator bahwa bakteri yang tumbuh adalah benar-benar bakteri *Shigella dysenteriae*.

E.1.3. Pembiakkan Bakteri *Salmonella typhi* dan *Shigella dysenteriae* pada Media Nutrient Agar (NA)

Biakan bakteri *Salmonella typhi* dan *Shigella dysenteriae* dari media cair Luria Broth diinokulasi dengan jarum ose steril, lalu

digoreskan secara zig-zag (*streak plate method*) pada medium agar NA dalam cawan petri yang telah disterilisasi. Kemudian dilakukan inkubasi pada suhu 37°C selama 16 - 18 jam (*overnight culture*) dengan aerasi *shaker* pada 150 rpm. Hasil biakan bakteri diperiksa setelah masa inkubasi tersebut. Munculnya koloni berwarna putih merupakan indikator bahwa bakteri yang tumbuh adalah benar-benar bakteri *Salmonella typhi* dan *Shigella dysenteriae*.

E.1.4. Pembuatan Gliserol Stok bakteri

Hal pertama yang dilakukan adalah mempersiapkan *overnight culture* bakteri *Salmonella typhi* dan *Shigella dysenteriae* yang telah dibiakkan dalam medium Luria Broth. Kemudian, 200 μ L *glycerol* (50%) yang berfungsi sebagai media tumbuh dimasukkan kedalam tabung mikrotube. Selanjutnya ditambahkan 800 μ L *overnight culture* bakteri *Salmonella typhi* dan *Shigella dysenteriae* masing – masing kedalam tabung tersebut. Campuran dalam tabung eppendorf dimasukan kedalam wadah berisi *dry ice* dan etanol 70% untuk membuat suhu -120°C. Kemudian gliserol stok disimpan pada suhu -20°C di dalam freezer.

E.2. Isolasi Genom Bakteri *Salmonella typhi* dan *Shigella dysenteriae* dari Biakan Murni

Isolasi genom bakteri *Salmonella typhi* dan *Shigella dysenteriae*, dari biakan murni bertujuan untuk mendapatkan isolat genom bakteri. Isolasi bakteri *Salmonella typhi* dan *Shigella dysenteriae* menggunakan

kit “*GeneJET Genomic DNA Purification Kit #K0721, #K0722 (Thermo Scientific)*”.

Tahapan yang dilakukan untuk proses isolasi genom bakteri dengan menggunakan kit “*GeneJET Genomic DNA Purification Kit #K0721, #K0722 (Thermo Scientific)*” adalah sebagai berikut : sebanyak 1 mL biakan bakteri yang telah ditumbuhkan 16 - 18 jam (*overnight culture*) dimasukkan dalam tabung mikrotube 1,5 mL lalu disentrifugasi pada kecepatan 5000 xg selama 10 menit sampai dihasilkan residu (*pellet* sel). Supernatan dikeluarkan dengan cara menuangkan sisa media kedalam *beaker glass* sebagai penampung yang sudah diberi desinfektan. Selanjutnya residu yang diperoleh ditambahkan 180 μ L *Digestion solution* untuk melisiskan dinding nukleus. Residu diresuspensi dengan cara pemipetan naik turun dari campuran tersebut sampai homogen.

Selanjutnya ditambahkan 20 μ L *Proteinase K Solution* pada cairan *lysat* bakteri untuk mengendapkan kandungan protein yang ada pada DNA. Diinkubasi pada 56°C selama 30 menit untuk melisiskan sel bakteri dan memaksimalkan pembersihan kandungan protein, kemudian didinginkan pada suhu kamar. Selanjutnya ditambahkan 20 μ L *RNAse Solution* pada cairan *lysat* bakteri untuk mengurai molekul RNA, kemudian di vortex dan didiamkan pada suhu kamar selama 10 menit. Selanjutnya ditambahkan 200 μ L *Lysis Solution*, di vortex selama 15 detik untuk menghomogenkan campuran. Selanjutnya ditambahkan 400

μ L etanol 50% untuk melarutkan senyawa - senyawa selain DNA, kemudian di vortex. Hasil *lysate sel* dipindahkan ke dalam *Purification colum*, kemudian di sentrifuge selama 1 menit pada kecepatan 8000 xg. Kemudian pellet yang didapat dilarutkan dalam 500 μ L *wash buffer I*. Dan di sentrifuge selama 1 menit pada 8000 xg. Kemudian pellet yang didapat, ditambahkan dalam 500 μ L *wash buffer II* untuk mencuci DNA dari pengotor dan di sentrifuge selama 3 menit pada 12.000 xg. Mengganti *collection tube column* dan menambahkan 200 μ L *Elution buffer* untuk mengikat pengotor selain DNA sehingga DNA terpisah secara sempurna dan di sentrifuge pada 8000 xg selama 1 menit. Isolat genom bakteri yang didapat kemudian dipindahkan kedalam tabung eppendorf 1.5 mL. Hasil isolasi genom bakteri ini disimpan pada suhu 2 – 8°C.

Hasil isolasi genom bakteri lalu dikarakterisasi dengan elektroforesis gel agarosa 1.5 % menggunakan pewarna etidium bromida. Sebanyak 8 μ L sampel hasil isolasi genom dicampur dengan 2 μ L *loading dye* 6x yang berfungsi sebagai pemberat agar sampel tidak keluar dari *well*, selanjutnya dimasukkan dalam *well* gel agarosa yang telah disiapkan dalam *chamber* alat *mini-sub DNA Electrophoresis Cell* yang telah diisi dengan buffer TAE 1X yang berfungsi untuk mempertahankan pH selama elektroforesis berlangsung. Elektroforesis dilakukan pada arus 70 volt selama 60 menit. Pemeriksaan hasil dilakukan dengan bantuan sinar UV. Dokumentasi hasil elektroforesis

dilakukan dengan pemotretan diatas lampu UV menggunakan alat dokumentasi.

E.3. Perancangan Primer Gen *fim-C Salmonella typhi* dan *Shigella dysenteriae*

Tahap ini adalah pencarian daerah variabel pada gen *fim-C Salmonella typhi* dan *Shigella dysenteriae* yang memiliki homologi rendah terhadap bakteri-bakteri lain. Selanjutnya dilakukan perancangan pasangan primer menggunakan program primer3 pada NCBI-Primer Tool. Primer hasil rancangan selanjutnya akan di sintesis oleh Macrogen inc.Korea (BioSM Indonesia).

E.4. Amplifikasi Pasangan Primer Bakteri *Salmonella typhi* dan *Shigella dysenteriae* Menggunakan PCR

Pasangan primer hasil rancangan akan dilakukan proses amplifikasi dengan sampel hasil isolasi DNA genom dari biakan murni bakteri *Salmonella typhi* dan *Shigella dysentriae* menggunakan PCR. Hasil PCR kemudian dikarakterisasi dengan elektroforesis gel agarosa. Proses PCR dilakukan dengan volume total 25 µL larutan yang mengandung 1 µL larutan *forward* primer, 1 µL larutan *reverse* primer 2 µL larutan *template* DNA bakteri, 12,5 µL larutan *Master Mix* PCR, dan 8,5 µL larutan *Nuclease Free Water*. Proses PCR dilakukan pada mesin *DNA-thermal Cycler* sebanyak 30 siklus, dengan masing-masing siklus terdiri atas tahap denaturasi pada suhu 95°C selama 30 detik, tahap

annealing pada suhu 56°C selama 30 detik, dan tahap elongasi pada suhu 72°C selama 1 menit.

Karakterisasi hasil amplifikasi PCR dilakukan dengan elektroforesis gel agarosa 2% menggunakan pewarna etidium bromida. Sebanyak 8 µL sampel hasil amplifikasi PCR dicampur dengan 2 µL *loading dye* 6x yang berfungsi sebagai pemberat agar sampel tidak keluar dari *well*, selanjutnya dimasukkan dalam *well* gel agarosa yang telah disiapkan dalam *chamber* alat *mini-sub DNA Electrophoresis Cell* yang telah diisi dengan buffer TAE 1X yang berfungsi untuk mempertahankan pH selama elektroforesis berlangsung. Elektroforesis dilakukan pada arus 70 volt selama 60 menit. Pemeriksaan hasil dilakukan dengan bantuan sinar UV. Dokumentasi hasil elektroforesis dilakukan dengan pemotretan diatas lampu UV menggunakan alat dokumentasi berupa kamera.

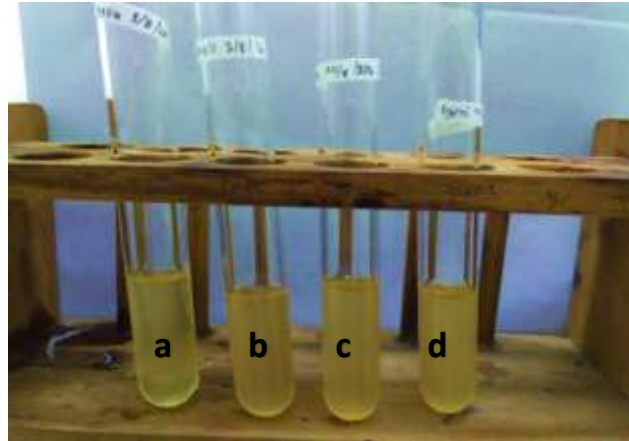
BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

Penelitian ini bertujuan untuk memberikan informasi mengenai hasil amplifikasi pasangan primer gen *fim*-C pada bakteri *Salmonella typhi* dan *Shigella dysenteriae* terhadap *template* bakteri uji sebagai alat deteksi pada tingkat genomik dengan menggunakan metode *Polymerase Chain Reaction* (PCR). Hasil penelitian diuraikan menjadi beberapa bagian sebagai berikut : A) Pembiakan bakteri *Salmonella typhi* dan *Shigella dysenteriae* dari biakan murni ; B) Isolasi DNA bakteri *Salmonella typhi* dan *Shigella dysenteriae* dari biakan murni dan C) Amplifikasi dan karakterisasi gen *fim*-C pada bakteri *Salmonella typhi* dan *Shigella dysenteriae*.

A. Pembiakan bakteri *Salmonella typhi* dan *Shigella dysenteriae* dari biakan murni

Pada penelitian ini, isolat DNA bakteri *Salmonella typhi* dan *Shigella dysenteriae* telah berhasil diisolasi. Proses isolasi DNA bakteri *Salmonella typhi* dan *Shigella dysenteriae* diawali oleh proses pembiakan bakteri dan karakterisasi bakteri *Salmonella typhi* dan *Shigella dysenteriae* dalam media padat *Salmonella – Shigella* Agar (SSA). Proses pembiakan bakteri *Salmonella typhi* dan *Shigella dysenteriae* dilakukan dalam media Luria Broth dan di inkubasi pada suhu 37°C selama 16 – 18 jam. Hasil inokulum bakteri *Salmonella typhi* dan *Shigella dysenteriae* ditunjukkan pada gambar 9.

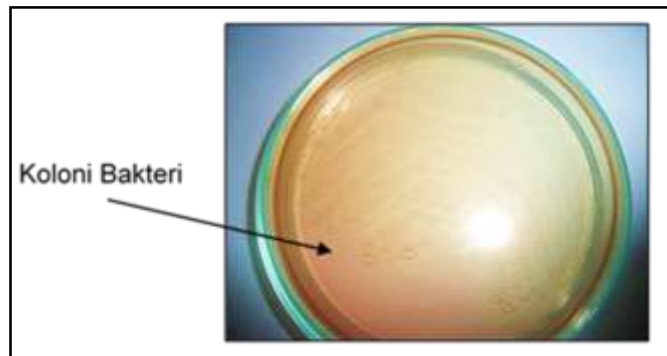


Gambar 9. Inokulum Bakteri *Salmonella typhi* dan *Shigella dysenteriae* dalam Media Luria Broth. a) dan b) Inokulum bakteri *Shigella dysenteriae* ; c) dan d) inokulum bakteri *Salmonella typhi*.

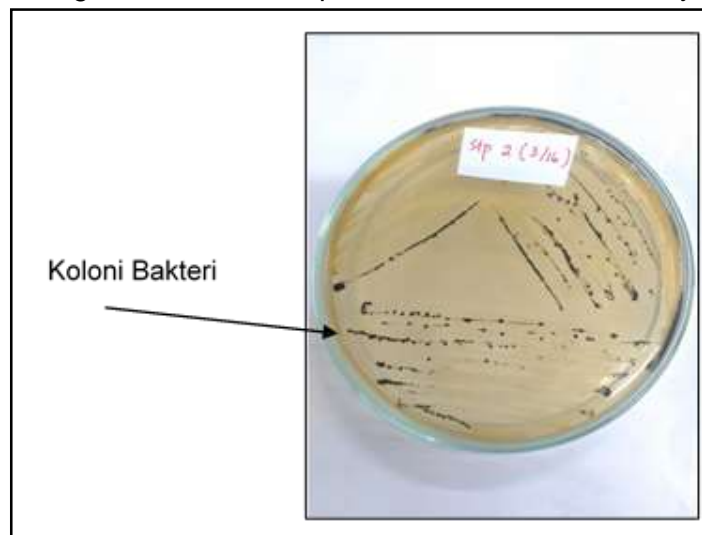
Media Luria Broth merupakan media yang baik untuk menstimulasi pertumbuhan bakteri. Media Luria Broth mengandung tiga komponen, yaitu Tripton, NaCl dan *Yeast Extract* yang diperlukan bakteri untuk berkembang biak (Himedia, 2015). Tumbuhnya bakteri *Salmonella typhi* dan *Shigella dysenteriae* pada media Luria Broth ditandai dengan keruhnya media Luria Broth. Hasil biakan bakteri *Salmonella typhi* dan *Shigella dysenteriae* pada media Luria Broth menunjukkan tingkat kekeruhan yang menandakan bahwa bakteri *Salmonella typhi* dan *Shigella dysenteriae* telah tumbuh.

Hasil inokulum bakteri *Salmonella typhi* dan *Shigella dysenteriae* selanjutnya akan dibiakan kembali dalam media padat selektif *Salmonella – Shigella* Agar (SSA) untuk mengkonfirmasi keberadaan bakteri *Salmonella typhi* dan *Shigella dysenteriae* dalam media Luria Broth. Pembiakan bakteri *Salmonella typhi* dan *Shigella dysenteriae* dalam media padat media selektif *Salmonella – Shigella* Agar (SSA) dilakukan dengan metode cawan gores dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 16 – 18 jam.

Hasil biakan bakteri *Salmonella typhi* dan *Shigella dysenteriae* ditunjukkan pada gambar 10 dan 11.



Gambar 10. Koloni Tak Berwarna Bakteri *Shigella dysenteriae*. Biakan bakteri *Shigella dysenteriae* dalam media *Salmonella – Shigella* Agar dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 18 jam.



Gambar 11. Koloni Hitam Bakteri *Salmonella typhi*. Biakan bakteri *Salmonella typhi* dalam media *Salmonella – Shigella* Agar dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 18 jam.

Media *Salmonella – Shigella* Agar (SSA) merupakan media padat selektif yang digunakan untuk pembiakan bakteri *Salmonella typhi* dan *Shigella dysenteriae*. Tumbuhnya bakteri *Salmonella typhi* ditandai dengan terbentuknya koloni hitam di atas permukaan media SSA sedangkan

untuk bakteri *Shigella dysenteriae* ditandai dengan terbentuknya koloni tak berwarna di atas permukaan media SSA (Himedia, 2011).

B. Isolasi bakteri *Salmonella typhi* dan *Shigella dysenteriae* dari biakan murni

Isolasi bakteri *Salmonella typhi* dan *Shigella dysenteriae* yang dilakukan dengan menggunakan *GeneJET Genomic DNA Purification Kit* #K0721, #K0722 (*Thermo Scientific*) telah berhasil dilakukan. Isolasi DNA bakteri *Salmonella typhi* dan *Shigella dysenteriae* dilakukan dalam media Luria Broth karena lebih mudah memisahkan bakteri yang tumbuh dengan media nya. Isolasi DNA bakteri menggunakan *GeneJET Genomic DNA Purification Kit* #K0721, #K0722 (*Thermo Scientific*) didasarkan pada metode pemurnian DNA menggunakan kolom purifikasi yang mengandung membran silika. Metode pemurnian DNA menggunakan kolom spin yang mengandung membran silika lebih efektif dan efisien dibandingkan dengan metode ekstraksi konvensional (Aini *et al*, 2011 ; Faatih, 2009).

Prinsip isolasi DNA bakteri menggunakan *GeneJET Genomic DNA Purification Kit* (*Thermo Scientific*) terdiri dari tiga tahap. Tahap pertama yaitu lisis sel dan membran plasma bakteri menggunakan larutan *Digestion Solution* dan *Lysis Solution*. Larutan *Digestion Solution* dan *Lysis Solution* memiliki peranan yang sangat penting dalam proses isolasi DNA bakteri. *Digestion Solution* merupakan larutan yang mengandung detergen dan *Lysis Solution* merupakan larutan yang mengandung garam dengan konsentrasi tinggi sehingga kedua larutan tersebut dapat melisis membran sel bakteri. Jika membran sel bakteri rusak, maka akan sangat

mudah bagi sel untuk lisis. Lisisnya sel bakteri akan menyebabkan keluarnya komponen – komponen sel bakteri dalam sitoplasma.

Tahap kedua yaitu penguraian struktur protein menggunakan larutan *Proteinase K Solution* dan penguraian struktur RNA menggunakan larutan *RNAse K Solution*. *Proteinase K Solution* berfungsi untuk menghilangkan kontaminan berupa protein dengan cara memotong ikatan peptida antara gugus karboksilat dan asam amino aromatik menjadi gugus karboksil dan asam amino hidrofobik. *RNAse K Solution* berfungsi untuk mendegradasi kontaminan berupa RNA. *RNAse K Solution* akan memutus ikatan fosfodiester antara ikatan 5' ribosa nukleotida dan gugus fosfat pada 3' ribosa nukleotida dari basa pirimidin membentuk 3' fosfat nukleosida (Promega, 2016 ; Worthington Biochemical Corporation, 2016 ; Thermo Scientifict, 2012).

Hasil *lysat* DNA bakteri yang sebelumnya sudah di degradasi kemudian ditambahkan dengan etanol 50% dan diletakkan pada kolom purifikasi dimana DNA akan terikat pada membran silika. DNA yang terikat pada membran silika kemudian ditambahkan larutan *Wash Buffer I* dan *Wash Buffer II* untuk pencuci DNA dari pengotor – pengotor lainnya. Kandungan etanol 96% yang ditambahkan pada *Wash Buffer I* dan *Wash Buffer II* membantu untuk mempercepat proses purifikasi DNA (Thermo Scientifict, 2012). Tahap ketiga adalah mengkonsentrasikan DNA yang diperoleh dengan menggunakan larutan *Elution Buffer*. Hasil isolat yang diperoleh selanjutnya akan digunakan untuk proses amplifikasi DNA

bakteri. Kemurnian dan konsentrasi DNA hasil isolasi selanjutnya diukur secara kuantitatif dengan menggunakan alat spektrofotometer Maestro Nanodrop. Hasil pengukuran ditunjukkan oleh tabel 1.

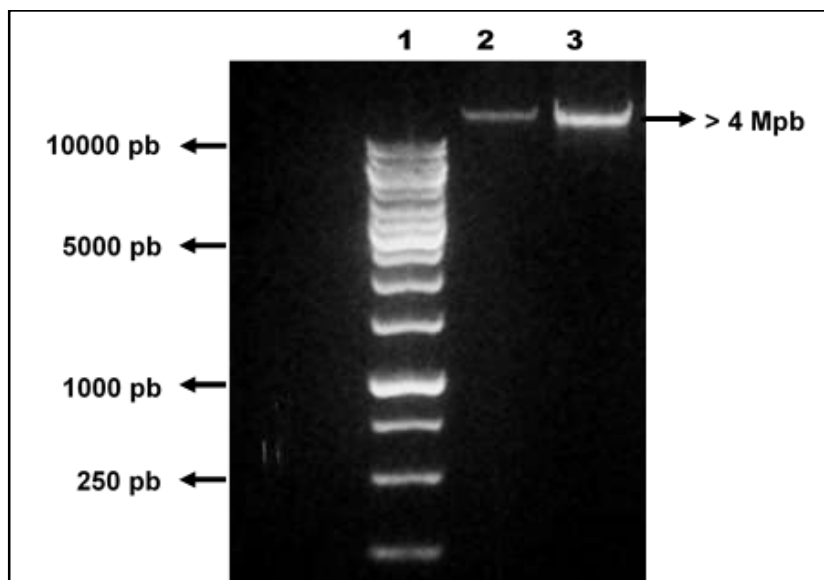
Tabel 1. Hasil Pengukuran Kemurnian dan Konsentrasi Hasil Isolasi DNA Menggunakan Maestro Nanodrop.

Bakteri	A_{260}/A_{280}	Konsentrasi (ng/ μ L)
<i>S. typhi</i>	1.847	121.0
<i>S. dysenteriae</i>	1.784	45.5

Kemurnian DNA hasil isolasi dilihat berdasarkan rasio A_{260}/A_{280} . Rasio A_{260}/A_{280} merupakan rasio perbandingan absorbansi pada panjang gelombang 260 nm dan 280 nm. Basa purin dan pirimidin dalam asam nukleat dapat menyerap cahaya pada panjang gelombang 260 nm sedangkan protein dapat menyerap cahaya pada panjang gelombang 280 nm. Pengukuran kemurnian hasil isolasi DNA yang baik memiliki rentang hasil absorbansi sebesar 1.8 – 2.0, hal ini dikarenakan bahwa hasil absorbansi ~ 1.8 menunjukkan kemurnian DNA dan ~ 2.0 menunjukkan kemurnian RNA pada rasio A_{260}/A_{280} (General Electric Company. 2012 ; Thermo Scientific, 2016). Pengukuran kemurnian hasil isolasi DNA bakteri *S. typhi* dapat dikatakan murni karena nilai absorbansi rasio A_{260}/A_{280} masih terdapat dalam kategori, yaitu 1.847 serta hasil isolasi DNA bakteri *S. dysenteriae* dapat dikatakan mendekati murni dengan nilai absorbansi rasio A_{260}/A_{280} masih terdapat dalam kategori, yaitu 1.784.

Hasil isolasi DNA bakteri *S. typhi* dan *S. dysenteriae* selanjutnya dikarakterisasi menggunakan metode elektroforesis gel agarosa 1.5%

selama 60 menit dengan arus 70 volt dengan penambahan pewarna etidium bromida. Hasil karakterisasi elektroforesis gel agarosa ditunjukkan pada gambar 12.



Gambar 12. Hasil Elektroforesis DNA Genom Bakteri *S. typhi* dan *S. dysenteriae* dengan Menggunakan Gel Agarosa 1.5%. 1) DNA ladder 1 Kb (*Thermo Scientific*), 2) Genom *S. dysenteriae* menghasilkan fragmen > 4 Mpb, 3) Genom *S. typhi* menghasilkan fragmen > 4 Mpb.

Hasil visualisasi elektroforesis gel agarosa 1.5% menunjukkan bahwa DNA genom bakteri *Salmonella typhi* dan *Shigella dysenteriae* telah berhasil diisolasi dengan menggunakan *GeneJET Genomic DNA Purification Kit* #K0721, #K0722 (*Thermo Scientific*). DNA genom bakteri yang telah berhasil diisolasi, hal ini ditandai dengan munculnya pita – pita DNA pada gel tersebut. Posisi pita – pita DNA berada di posisi paling tinggi dari marker DNA yaitu > 100.000 pb (pasang basa) atau > 10 Kb (*Kilo base pair*). Munculnya pita – pita DNA pada ukuran > 10 Kb menunjukkan bahwa hasil ini sesuai dengan informasi *database* ukuran genom untuk bakteri

Salmonella typhi yaitu sebesar ± 4.8 Mpb (Mega pasang basa) dan bakteri *Shigella dysenteriae* sebesar ± 4.37 Mpb (Mega pasang basa) (Deng *et al.*, 2003 ; Yang *et al.*, 2005).

Hasil visualisasi elektroforesis gel agarosa 1.5% pada DNA genom bakteri *Shigella dysenteriae* dan *Salmonella typhi* terlihat pita tunggal yang bersih tanpa *smear* mengindikasikan tingkat kemurnian DNA genom baik (DNA tidak terdegradasi dan terkontaminan), tetapi pita yang muncul pada DNA genom bakteri *Shigella dysenteriae* terlihat sangat tipis dan DNA genom bakteri *Salmonella typhi* terlihat pita yang dihasilkan tebal. Ketebalan pita yang didapatkan bergantung pada konsentrasi DNA genom dan menandakan bahwa DNA genom yang diisolasi dalam keadaan utuh. Konsentrasi DNA genom yang rendah akan menghasilkan pita yang tipis sedangkan konsentrasi DNA genom yang tinggi akan menghasilkan pita yang tebal (Tenriulo *et al*, 2001).

C. Amplifikasi dan Karakterisasi Pasangan Primer Bakteri *Salmonella typhi* dan *Shigella dysenteriae* Menggunakan PCR

Pasangan primer gen *fim-C* bakteri *Salmonella typhi* dan *Shigella dysenteriae* telah berhasil dirancang. Perancangan primer dilakukan menggunakan program Primer - BLAST pada laman NCBI melalui <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>. Primer BLAST merupakan program yang digunakan untuk merancang primer yang berguna sebagai pembatas fragmen DNA target yang akan diamplifikasi. Program ini akan memberikan beberapa pilihan kandidat pasangan primer yang dapat digunakan.

Pasangan primer yang dipilih harus memiliki panjang primer berkisar 15 – 30 nukleotida, memiliki *temperature melting* (Tm) yang tidak jauh berbeda antara satu dengan yang lain, dan memiliki konten % G + C sebesar 40 – 60% (McPherson dan Møller, 2006 ; Handoyo dan Rudiretna, 2001 ; Thermo Scientific, 2012). Pasangan primer gen *fim-C* bakteri *Salmonella typhi* dan *Shigella dysenteriae* ditunjukkan pada tabel 2.

Tabel 2. Pasangan Primer Bakteri *Salmonella typhi* dan *Shigella dysenteriae*

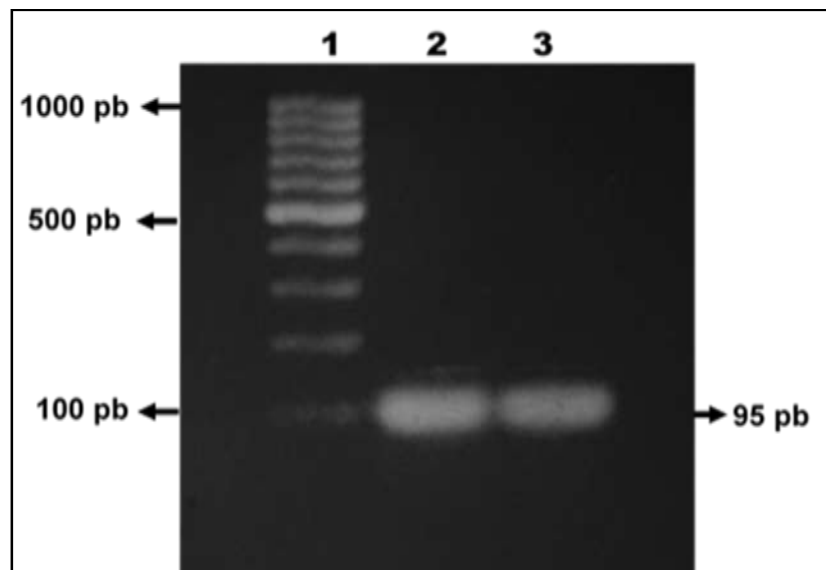
No.	Oligo	Primer (5'>3')	Panjang (pb)	Tm (°C)	%GC	Panjang amplikon (pb)
1.	F_ <i>S. typhi</i>	AATCCCTTACCGA CTGGCG	20	60.5	55.0	95
	R_ <i>S. typhi</i>	AACCGAGACTGGC TGTTGTC	20	60.5	55.0	
2.	F_ <i>S. dysenteriae</i>	ACAGCTACAGTT AGCCAGC	20	60.5	55.0	153
	R_ <i>S. dysenteriae</i>	CTGGTGGTGACCG AACTGAA	20	60.5	55.0	

Isolat DNA bakteri *Salmonella typhi* dan *Shigella dysenteriae* yang telah berhasil diisolasi sebelumnya kemudian dilakukan proses amplifikasi DNA target terhadap pasangan primer gen *fim-C* bakteri *Salmonella typhi* dan *Shigella dysenteriae* menggunakan PCR. Selain membutuhkan pasangan primer, proses amplifikasi juga membutuhkan komponen DNA *template*. DNA *template* yang digunakan dalam proses amplifikasi ini adalah DNA genom bakteri hasil isolasi sebelumnya. Konsentrasi DNA *template* yang digunakan untuk proses amplifikasi DNA berkisar antara 0.001 - 1000 ng (Themoscientific, 2012). Pada penelitian ini digunakan konsentrasi DNA *template* yaitu 242 ng untuk DNA *template S.typhi* dan 227.5 ng dan 187.5 ng untuk DNA *template S.dysenteriae*. Buffer PCR,

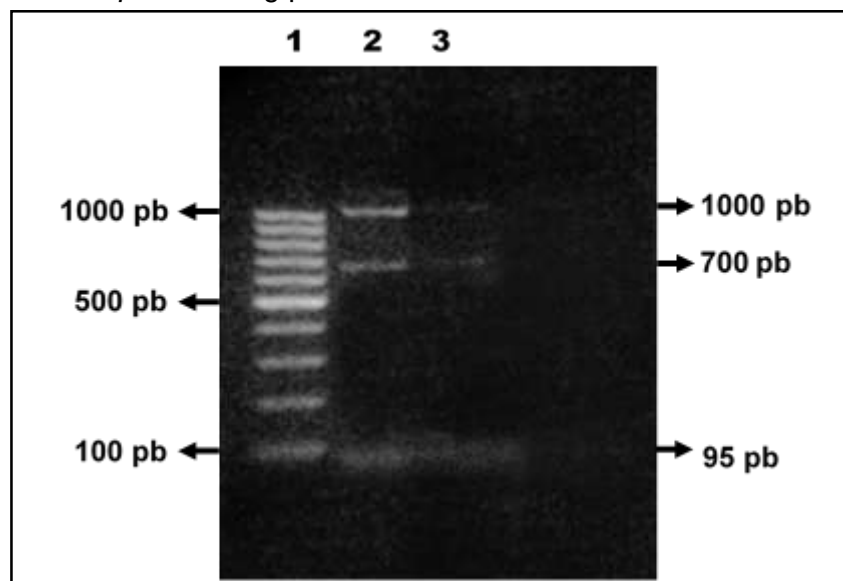
MgCl₂, dNTP dan enzim DNA Polimerase juga dibutuhkan dalam proses amplifikasi.

Proses amplifikasi pasangan primer bakteri *Salmonella typhi* dan *Shigella dysenteriae* telah berhasil dilakukan dalam 30 siklus, masing - masing siklus terdiri dari tiga tahapan, yaitu tahap denaturasi dengan suhu 92°C selama 30 detik, tahap *annealing* dengan suhu 56°C selama 30 detik dan tahap elongasi dengan suhu 72°C selama 1 menit. Penggunaan suhu *annealing* sebesar 56°C ditentukan oleh *melting temperature* (T_m). Suhu *annealing* (T_a) adalah suhu yang digunakan untuk penempelan primer pada DNA *template* dan *melting temperature* (T_m) merupakan suhu dimana 50% untaian ganda DNA terpisah. Suhu *annealing* yang digunakan dapat dihitung berdasarkan T_m – 5°C sampai dengan T_m + 5°C (Handoyo dan Rudiretna, 2001).

Proses amplifikasi dilakukan untuk mengetahui kemampuan pasangan primer dalam mengamplifikasi DNA *template* bakteri uji. Dalam hal ini proses amplifikasi dilakukan dengan pasangan primer bakteri *Salmonella typhi* terhadap DNA *template* bakteri *Salmonella typhi* dan primer bakteri *Shigella dysenteriae* terhadap DNA *template* bakteri *Shigella dysenteriae*. Hasil amplifikasi pasangan primer bakteri *Salmonella typhi* dan *Shigella dysenteriae* dikarakterisasi dengan menggunakan metode elektroforesis gel agarosa 2%. Hasil amplifikasi pasangan primer bakteri *Salmonella typhi* dan *Shigella dysenteriae* ditunjukkan oleh gambar 13 dan *Shigella dysenteriae* ditunjukkan oleh gambar 14.



Gambar 13. Hasil Amplifikasi Primer *S. typhi* dan di Elektroforesis dengan Menggunakan Gel Agarosa 2 % dengan Suhu *annealing* 56°C.
 1) DNA ladder 100 pb ; 2) Primer *S. typhi* terhadap DNA *template S. typhi* menghasilkan fragmen ± 95 pb.dengan konsentrasi DNA *template* 242 ng/μL; 3) Primer *S. typhi* terhadap DNA *template S. typhi* menghasilkan fragmen ± 95 pb dengan konsentrasi DNA *template* 242 ng/μL.



Gambar 14. Hasil Amplifikasi Primer *S. dysenteriae* dan di Elektroforesis dengan Menggunakan Gel Agarosa 2 % dengan Suhu *annealing* 56°C.
 1) DNA ladder 100 pb ; 2) Primer *S. dysenteriae* terhadap DNA *template S. dysenteriae* menghasilkan fragmen ± 95 pb, ± 700 pb dan ± 1000 pb dengan konsentrasi DNA *template* 227.5 ng/μL ; 3) Primer *S. dysenteriae* terhadap DNA *template S. dysenteriae* menghasilkan fragmen ± 95 pb, ± 700 pb dan ± 1000 pb dengan konsentrasi DNA *template* 187.5 ng/μL.

Hasil amplifikasi pasangan primer bakteri *Salmonella typhi* ditunjukkan pada gambar 13 dengan suhu *annealing* 56°C telah mengamplifikasi DNA *template* bakteri *Salmonella typhi* dengan munculnya pita (*band*) yang cukup tebal pada fragmen sebesar ± 95 pb (pasang basa). Gambar 13 pada posisi 2 dan 3 merupakan dua kali pengulangan untuk masing – masing DNA *template*. Munculnya fragmen sebesar ± 95 pb membuktikan bahwa pasangan primer bakteri *Salmonella typhi* berhasil mengamplifikasi DNA *template* bakteri *Salmonella typhi* hal ini sesuai dengan rancangan panjang ampikon dari pasangan primer *Salmonella typhi* yang dirancang dari gen *fimC* yaitu sebesar ± 95 pb, dimana pasangan primer bakteri *Salmonella typhi* gen *fimC* terletak pada posisi 597283 – 597975 dari urutan kromosom *Salmonella enterica subsp. enterica serovar typhi*. Suhu *annealing* 56°C dianggap tepat untuk reaksi PCR pada amplifikasi pasangan primer *Salmonella typhi* dengan munculnya pita (*band*) yang cukup tebal pada fragmen sebesar ± 95 pb.

Amplifikasi bakteri *Shigella dysenteriae* ditunjukkan pada gambar 14. Gambar 14 pada posisi 2 dan 3 merupakan dua kali pengulangan dengan konsentrasi DNA *template* yang berbeda. Hasil amplifikasi pasangan primer bakteri *Shigella dysenteriae* dengan suhu *annealing* 56°C telah mengamplifikasi DNA *template* bakteri *Shigella dysenteriae* dengan munculnya pita (*band*) pada fragmen sebesar ± 95 pb, ± 700 pb dan ± 1000 pb. Ketebalan pita (*band*) pada hasil amplifikasi ditentukan dari konsentrasi DNA *template* yang digunakan dalam proses amplifikasi. Pada posisi 2

terlihat pita (*band*) yang cukup tebal karena tingginya konsentrasi DNA *template* yang digunakan yaitu 227.5 ng/ μ L dan posisi 3 terlihat pita (*band*) yang sangat tipis karena rendahnya konsentrasi DNA *template* yang digunakan yaitu 187.5 ng/ μ L pada fragmen sebesar \pm 95 pb, \pm 700 pb dan \pm 1000 pb. Munculnya pita (*band*) pada fragmen sebesar \pm 95 pb, \pm 700 pb dan \pm 1000 pb dalam hasil amplifikasi pasangan primer bakteri *Shigella dysenteriae* dengan DNA *template* bakteri *Shigella dysenteriae* tidak sesuai dengan rancangan panjang ampikon dari pasangan primer *Shigella dysenteriae* yang dirancang dari gen *fimC* yaitu \pm 153 pb. Peneliti berasumsi, munculnya pita (*band*) dalam berbagai fragmen pada hasil amplifikasi pasangan primer bakteri *shigella dysenteriae* terhadap DNA *template* bakteri *Shigella dysenteriae* di suhu *annealing* 56⁰C dikarenakan pasangan primer bakteri *Shigella dysenteriae* yang telah dirancang dengan panjang ampikon 153 pb diduga memiliki homologi yang tinggi terhadap urutan keseluruhan genom DNA pada kromosomnya mengingat bahwa bakteri *Shigella dysenteriae* memiliki panjang genom sebesar \pm 4.37 Mpb (mega pasang basa) (NCBI, 2016).

BAB V

KESIMPULAN DAN SARAN

A. Kesimpulan

DNA genom bakteri *Salmonella typhi* dan *Shigella dysenteriae* dari biakan murni telah berhasil diisolasi menggunakan *GeneJET Genomic DNA Purification Kit (Thermo Scientific)*. Konsentrasi DNA genom yang didapat dari hasil isolasi pada bakteri *Salmonella typhi* sebesar 121.0 ng/ μ L dan bakteri *Shigella dysenteriae* sebesar 45.5 ng/ μ L. Pasangan primer bakteri *Salmonella typhi* dari gen *fim-C* mampu mengamplifikasi DNA *template* dari bakteri *Salmonella typhi* menggunakan metode PCR pada suhu *annealing* 56° dan hasil amplifikasi dikarakterisasi menggunakan elektroforesis gel agarosa 2% menghasilkan pita (*band*) yang cukup tebal pada fragmen \pm 95 pb. Pasangan primer bakteri *Shigella dysenteriae* dari gen *fim-C* mampu mengamplifikasi DNA *template* dari bakteri *Shigella dysenteriae* menggunakan metode PCR pada suhu *annealing* 56° dan hasil amplifikasi dikarakterisasi menggunakan elektroforesis gel agarosa 2% menghasilkan pita (*band*) pada fragmen \pm 95 pb, \pm 700 pb dan \pm 1000 pb.

B. Saran

Berdasarkan hasil yang diperoleh, maka perlu dilakukan penelitian lanjutan untuk pengujian pasangan primer bakteri *Salmonella typhi* dan *Shigella dysenteriae* sehingga hasil yang diperoleh dapat diaplikasikan langsung dalam mendeteksi sampel makanan dan minuman yang terkontaminasi bakteri *foodborne pathogen*.

DAFTAR PUSTAKA

- Acumedia. 2011. *Salmonella Shigella Agar (7152)*. Neogen Corporation. USA.
- Aini, A. N., S. Ria, P., Aminin. A. L. N. 2011. Pemurnian DNA Plasmid Puc19 Menggunakan Kolom Silika dengan Denaturan Urea. *Jurnal Sains dan Matematika*, vol. 19 (2) : 47 – 53.
- Baron, Samuel.1996. *Medical Microbiology, 4th Edition*. Texas : University of Texas Medical Branch.
- BPOM. 2016. *Berita Keracunan Bulan Juli – September 2016*. <http://ik.pom.go.id/v2016/berita-keracunan/berita-keracunan-bulan-juli-september-2016>, diakses tanggal 12 Februari 2017, pukul 10.51WIB.
- Chang, C.M., Chang, W. H., Wang, C. H., Wang, J. H., Mai. J.D.,_ Lee, G. B. 2013. Nucleic Acid Amplification using Microfluidic Systems. *Lab Chip*, Vol.13 :1225 - 1242
- D.G. Pradnyaniti., I.N. Wirajana., S.C. Yowani. 2013. Desain Primer Secara *in Silico* untuk Amplifikasi Fragmen Gen *rpob Mycobacterium tuberculosis* dengan *Polymerase Chain Reaction (PCR)*. *Jurnal Farmasi Udayana*, Vol. 2, No. 3 : 124 - 130
- De Freitas, C. G., Santana, A. P., Caldeira Da Silva, P. H., Gonçalves, V. S. P., Barros, M. D. A., Torres, F. A. G., Murata, L., Perecmanis, S. 2010. PCR Multiplex for Detection of *Salmonella enteritidis*, *typhi* and *typhimurium* and Occurrence in Poultry Meat. *International Journal Of Food Microbiology*, 139 : 15 – 22.
- Deng, W., Liou, S. R., Burland, V., Plunkett III, G., Kodoyianni, V., Mayhew, G. F., Blattner, F. R., Schwartz, D. C., Rose, D. J. 2003. Comparative Genomics of *Salmonella Enterica* Serovar *typhi* Strains Ty2 and CT18. *Journal of Bacteriology*, Vol. 185, No. 7, 2330 – 2337.
- Dougan, G., Baker, S. 2014. *Salmonella Enterica* Serovar *typhi* and the Pathogenesis of Typhoid Fever. *Annual Review Of Microbiology*, Vol. 68 : 317 – 336.
- Drahovská, H., Turna, J., Piknová, L., Kuchta, T., Sztításová, I., Sásik, M. 2001. Detection of *Salmonella* by Polymerase Chain Reaction

- Targeted to *Fim-C* Gene. *Biologia, Bratislava*, Vol. 56 No. 6 : 611–616.
- Faatih, Mukhlissul. 2009. Isolasi dan Digesti DNA Kromosom : Isolation and Digestion of Chromosomal DNA. *Jurnal Penelitian Sains & Teknologi*, Vol. 1. No. 1 : 61 – 67
- Fàbrega, A., Vila, J. 2013. *Salmonella Enterica* Serovar *typhimurium* Skills to Succeed in the Host : Virulence and Regulation. *Clinical Microbiology Reviews*, Vol. 26, No. 2 : 308 – 341.
- Fei Law, J. W., Ab Mutalib, N. S., Chan, K. G., Lee, L. H. 2015. Rapid Methods for the Detection of Foodborne Bacterial Pathogens : Principles, Applications, Advantages and Limitations. *Food Microbiology*, Vol. 5, No. 770 : 1 – 9.
- Fessenden dan Fessenden. 1986. *Kimia Organik. Jilid II. Edisi Ketiga*. Jakarta : Erlangga.
- Food Standards Agency. 2010. *Foodborne Disease Strategy 2010-15 : An FSA Programme for the Reduction of Foodborne Disease In the UK*.
<https://www.food.gov.uk/sites/default/files/multimedia/pdfs/fds2015.pdf>, diakses tanggal 14 November 2016, pukul 11.04WIB.
- Fu, X. T., Kim, S. M. 2010. Agarase: Review of Major Sources, Categories, Purification Method, Enzyme Characteristics and Applications. *Marine Drugs*, Vol. 8 : 200 – 218.
- Gal-Mor, O., C.Boyle. E., A. Grassl, G. 2014. Same Species, Different Diseases: How and Why Typhoidal and Non-Typhoidal *Salmonella Enterica* Serovars Differ. *Microbial Immunology*, Vol. 5, Article 391 : 1 – 10.
- General Electric Company. 2012. *Spectrophotometry Handbook*. UK : GE Healthcare Life Sciences.
- Gerstein, Alan S. 2001. *Molecular Biology Problem Solver*. New York : Wiley-Liss, Inc.
- Handoyo, D., Rudiretna, A. 2001. Prinsip Umum dan Pelaksanaan Polymerase Chain Reaction (PCR) : General Principles And Implementation Of Polymerase Chain Reaction. *Unitas*, Vol. 9, No. 1 : 17 – 29.
- Himedia. 2011. *SS Agar (Salmonella Shigella Agar)*.
<http://himedialabs.com/TD/MP108.pdf> diakses tanggal 10 Desember 2016, pukul 15.45 WIB.

- Irawan, Hery. 2014. *Analisis DNA*. http://hery-irawan-fpk11.web.unair.ac.id/artikel_detail-107839-Umum-Analisis%20DNA.html, diakses tanggal 12 Februari 2017, pukul 14.48 WIB.
- Joshi, M., J. D., Deshpande. 2010. Polymerase Chain Reaction : Methods, Principles and Application. *International Journal of Biomedical Research*, 1[5] : 81 – 97.
- Kunkel, Dennis. 2011. *Shigella dysenteriae*. https://www.sciencephoto.com/search?subtype=keywords&searchstring=Shigella+dysenteriae&Search.x=40&Search.y=9&media_type=images&license=all&channel=all, diakses tanggal 5 Oktober 2016, pukul 20.35 WIB.
- Lee, P. Y., Costumbrado, J., Hsu, C. Y., Kim, Y. H. 2010. Agarose Gel Electrophoresis for the Separation of DNA Fragments. *Journal of Visualized Experiments*, (62), E3923, 1 – 5.
- Madigan, M.T., Martinko, J.M., Stahl, D.A., Clark, D.P. 2011. *Brock Biology of Microorganisms*. San Francisco : Pearson Education, Inc.
- Malorny, B. 2013. *Diagnostic Real-Time PCR for Detection of Salmonella in Food and Characterization of Epidemiologically Important Salmonella Enterica Subsp. Enterica Serovars Isolated from Livestock, Food And Humans*. Thesis. Berlin : Universität Berlin.
- Møller, S. G., Mcpherson, M. J. 2006. *PCR Second Edition*. UK : Taylor & Francis Group.
- Muktiningsih., Kurniadewi, F., S. Dahlia., 2010. *Pengembangan metode deteksi bakteri penyebab penyakit typhus pada manusia dengan Polymerase Chain Reaction*. Laporan penelitian Hibah Kompetisi Lemlit UNJ.
- NCBI. 2016. *BLAST Results*. <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>, diakses tanggal 18 Desember 2016, pukul 19.20 WIB.
- NCBI. 2016. *fimC : fimbrial chaperone protein [Salmonella enterica subsp. enterica serovar Typhi str. CT18]*. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/1247059>, diakses tanggal 25 Oktober 2016, pukul 20.15 WIB.
- NCBI. 2016. *ybgP chaperone [Shigella dysenteriae Sd197]*. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/?term=fimC+shigella+dysenteriae>, diakses tanggal 25 Oktober 2016, pukul 20.16 WIB.

- NCBI. 2016. *Shigella dysenteriae* Sd197 chromosome, complete genome. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NC_007606, diakses tanggal 25 Oktober 2016, pukul 20.25 WIB.
- Nurjayadi, M., Kurniadewi, F., S, Dahlia. 2010. *Pengembangan Metode Deteksi Bakteri Penyebab Penyakit Typhus pada Manusia dengan Polymerase Chain Reaction*. Laporan penelitian Hibah Kompetisi Lemlit UNJ. Jakarta.
- Porwollik, S., Boyd, E. F., Choy, C., Cheng, P., Florea, L., Proctor, E., McClelland, M. 2004. Characterization of *Salmonella enterica* subspecies I Genovars By Use of Microarrays. *Journal Of Bacteriology*, Vol. 186, No. 17, 5883 – 5898.
- Promega Corporation. 2016. *RNase A Solution*. <https://worldwide.promega.com/products/biochemicals-and-labware/biochemical-buffers-and-reagents/rnase-a-solution/>, diakses tanggal 18 Desember 2016, pukul 20.48 WIB.
- Public Health Agency of Canada. 2010. *Shigella* spp : *Pathogen Safety Data Sheet - Infectious Substances*. <http://www.phac-aspc.gc.ca/lab-bio/res/psds-ftss/shigella-eng.php>, diakses tanggal 24 Desember 2016, pukul 15.02 WIB.
- Schroeder, G. N., Hilbi, H. 2008. Molecular Pathogenesis of *Shigella* spp.: Controlling Host Cell Signaling, Invasion, and Death by Type III Secretion. *Clinical Microbiology Reviews*, Vol. 21, No. 1, 134 – 156.
- Setianingsih, Ida. 2015. *Produksi, Karakterisasi, dan Uji Stabilitas Protein Fim-C Inclusion Bodies Salmonella typhi*. Skripsi. Jakarta : Prodi Kimia, FMIPA, UNJ.
- Tenriulo, A., Suryati, E., Parenrengi, A., Rosmiat. 2001. Ekstraksi DNA Rumput Laut *Kappaphycus alvarezii* dengan Metode Fenol Kloroform. *Marina Chimica Acta*, Vol. 2. No. 2 : 6 – 10
- Thermo Scientific. 2012. *PCR Master Mix (2X)*. <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/K0171>, diakses tanggal 21 Desember 2016, pukul 14.06 WIB.
- Thermo Scientific. 2012. *RNase A, DNase and Protease-Free*. https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/MAN0012003_RNase_A_DNase_Proteasefree_UG.pdf, diakses tanggal 21 Desember 2016, pukul 14.08 WIB.

- Thermo Scientific. 2014. *Assessment of Nucleic Acid Purity*. <http://www.nanodrop.com/Library/T042-NanoDrop-Spectrophotometers-Nucleic-Acid-Purity-Ratios.pdf>, diakses tanggal 21 Desember 2016, pukul 14.015 WIB.
- Thermo Scientific. 2014. *Thermo Scientific GeneJET Genomic DNA Purification Kit*. https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/MAN0012663_GeneJET_Genomic_DNA_Purification_Kit_UG.pdf, diakses tanggal 21 Desember 2016, pukul 14.06 WIB.
- Thermo Scientific. 2016. *Detergents for Cell Lysis and Protein Extraction*. <https://www.thermofisher.com/id/en/home/life-science/protein-biology/protein-biology-learning-center/protein-biology-resource-library/pierce-protein-methods/detergents-cell-lysis-protein-extraction.html>, diakses tanggal 18 Desember 2016, pukul 19.45 WIB.
- Todar, K. 2012. *Todar's Online Textbook of Bacteriology*. www.Textbookofbacteriology.Net/Themicrobialworld/Salmonella, diakses Tanggal 5 November 2016, Pukul 13.46 WIB.
- Todar, K. 2012. *Shigella* and Shigellosis. <http://textbookofbacteriology.net/Shigella.html>, diakses tanggal 17 September 2016, pukul 19.20 WIB.
- Velusamy, V., Arshak, K., Korostynska, O., Oliwa, K., Adley, C. 2010. An Overview of Foodborne Pathogen Detection : In the Perspective of Biosensors. *Biotechnology Advances*, 28 : 232 – 254.
- Vollaard, A. M., Ali, S., Van Asten, H.A.G.H., Ismid, I. S., Widjaja, S., Visser, L. G., Surjadi, Ch., Van Dissel, J. T. 2004. Risk Factors for Transmission of Foodborne Illness in Restaurants and Street Vendors in Jakarta, Indonesia. *Epidemiol Infect*, 132 : 863 – 872.
- World Health Organization. 2005, *Guidelines for the Control of Shigellosis, Including Epidemics Due to Shigella dysenteriae* 1. WHO Press, Switzerland.
- Worthington Biochemical Corporation. 2016. *Proteinase K*. <http://www.worthington-biochem.com/rnase/default.html>, diakses tanggal 18 Desember 2016, pukul 20.39 WIB.
- Worthington Biochemical Corporation. 2016. *Ribonuclease A*. <http://www.worthington-biochem.com/rnase/default.html>, diakses tanggal 18 Desember 2016, pukul 21.09 WIB.

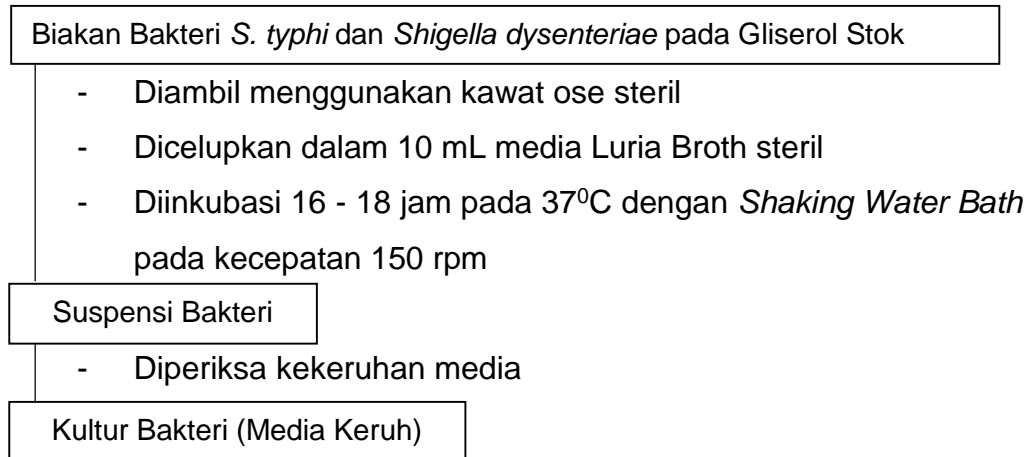
- Wray, C., Wray, A. 2000. *Salmonella in Domestic Animals*. USA : CABI.
- Yang, F., Yang, J., Zhang, X., Chen, L., Jiang, Y., Yan, Y., Tang, X., Sun, L., Wang, J., Chen, S., Xiong, Z., Nie, H., Dong, J., Peng, J., Xue, Y., Xu, J., Zhu, J., Wang, Y., Yuan, Z., Wen, Y., Yao, Z., Shen, Y., Qiang, B., Hou, Y., Jin, Q. 2005. Genome Dynamics and Diversity of *Shigella* species, the Etiologic Agents of *Bacillary dysentery*. *Nucleic Acids Research*, Vol. 33, No. 19, 6445 – 6458.
- Yusuf, Z. K. 2010. Polymerase Chain Reaction (PCR). *Saintek*, Vol. 5, No. 6.

LAMPIRAN

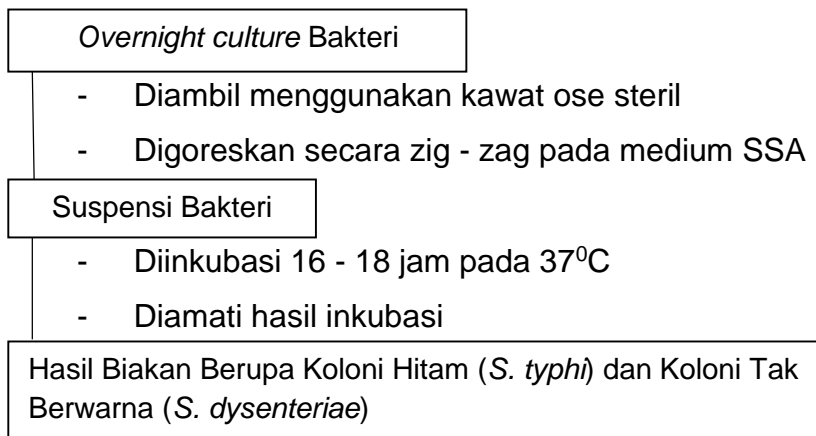
Lampiran 1. Bagan Alir

E.1. Pembiakan Bakteri

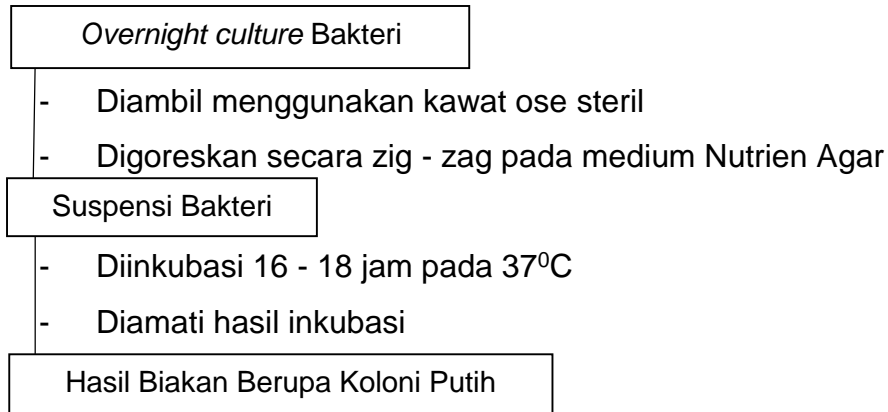
1.1. Pembiakkan Bakteri *S. typhi* dan *S. dysenteriae* pada Media Luria Broth



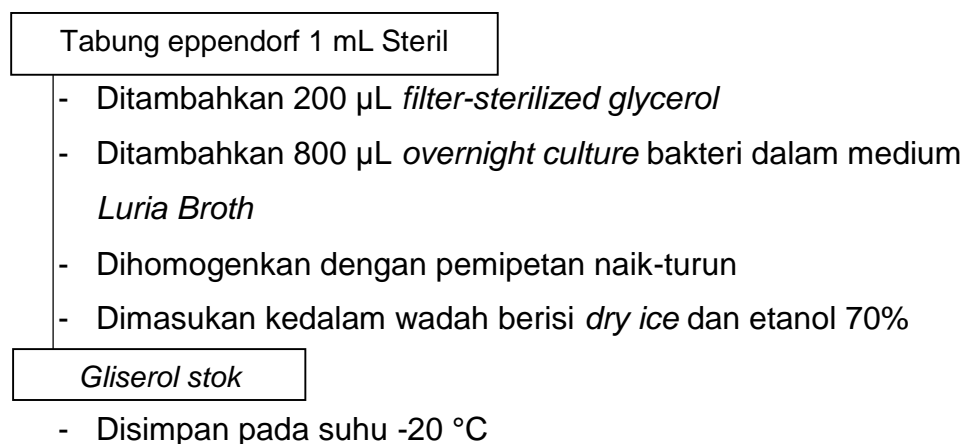
1.2. Pembiakkan Bakteri *S. typhi* dan *S. dysenteriae* pada Media *Salmonella - Shigella* Agar (SSA)



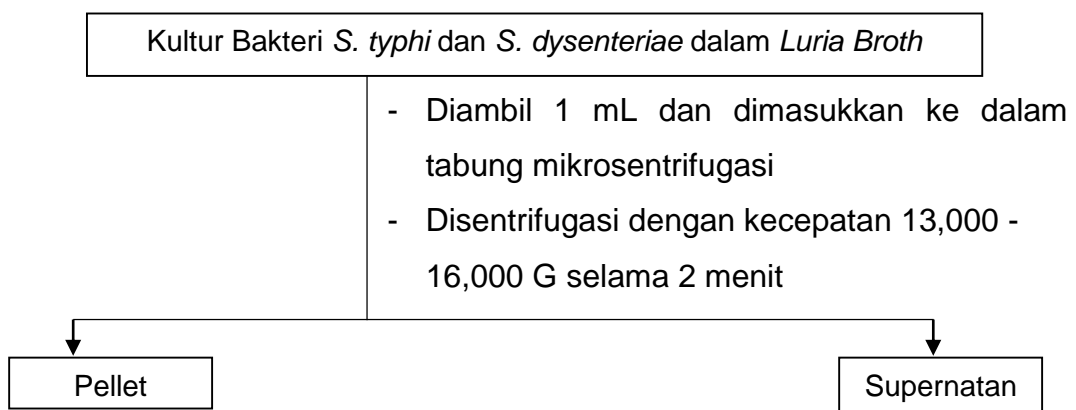
1.3. Pembiakkan Bakteri *S. typhi* dan *S. dysenteriae* pada Media Nutrien Agar

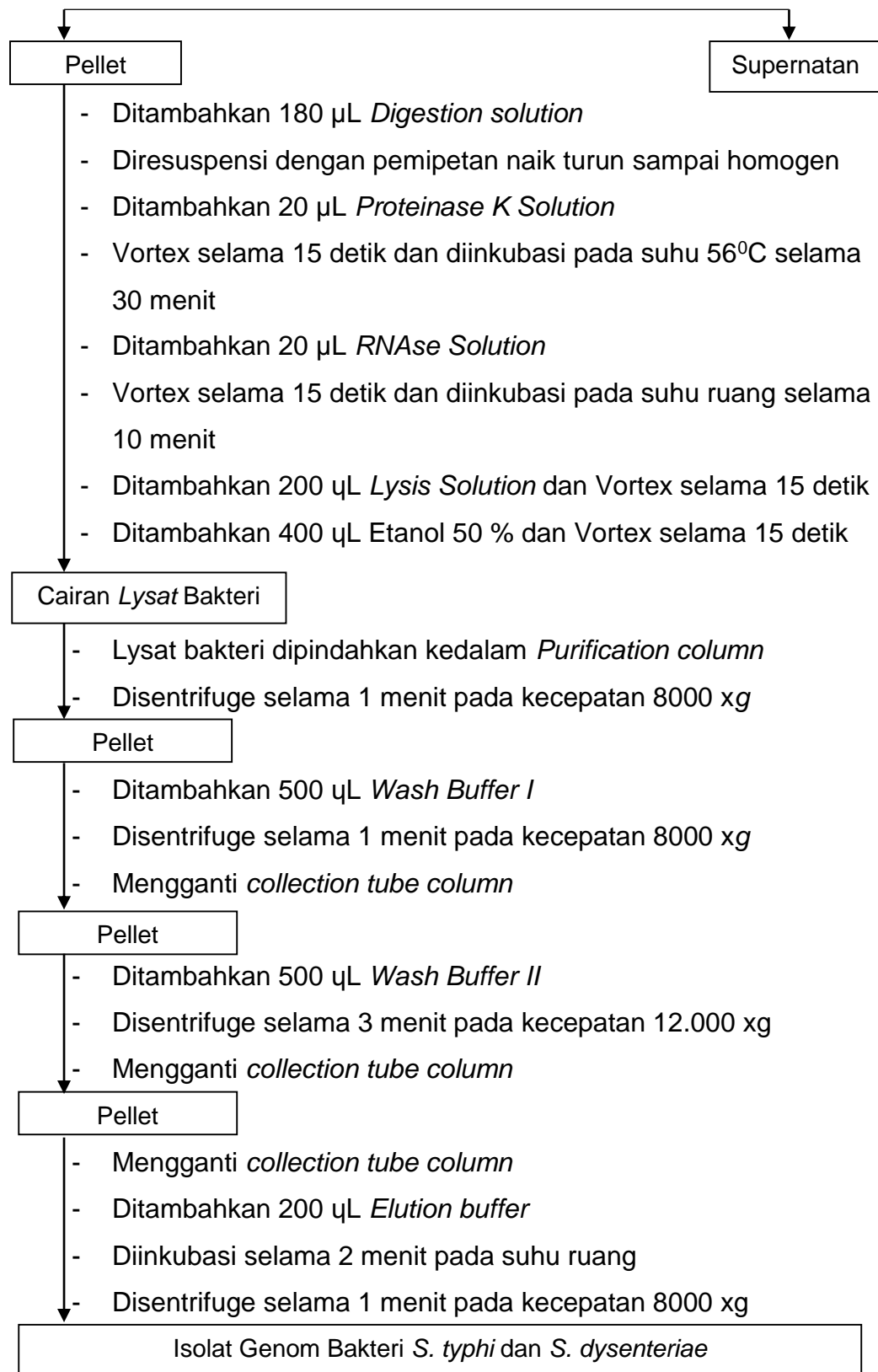


1.4. Pembuatan Gliserol Stok Bakteri *S. typhi* dan *S. dysenteriae*

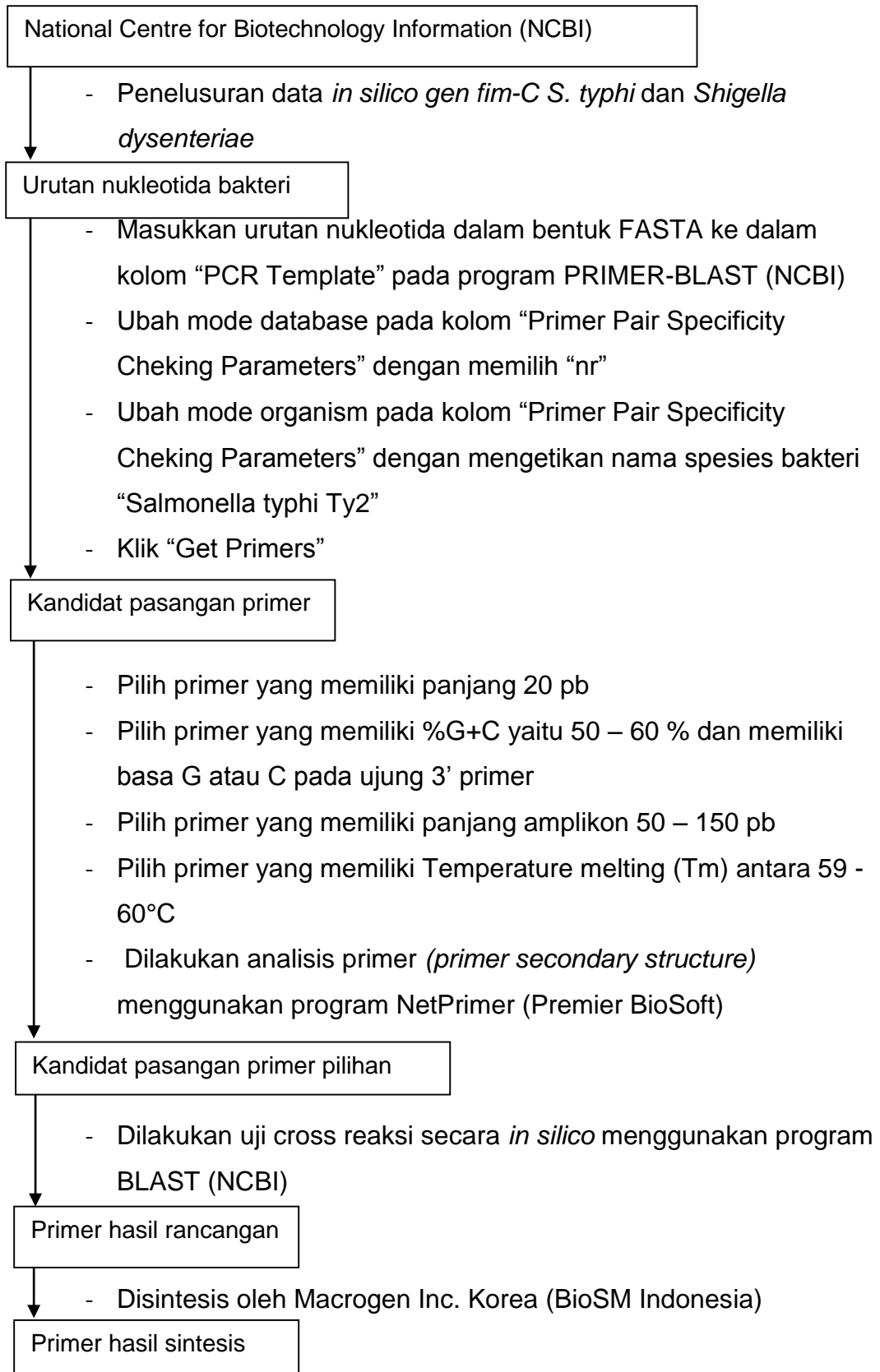


E.2. Isolasi Genom Bakteri *Salmonella typhi* dan *Shigella dysenteriae* dari Biakan Murni dan Karakterisasinya



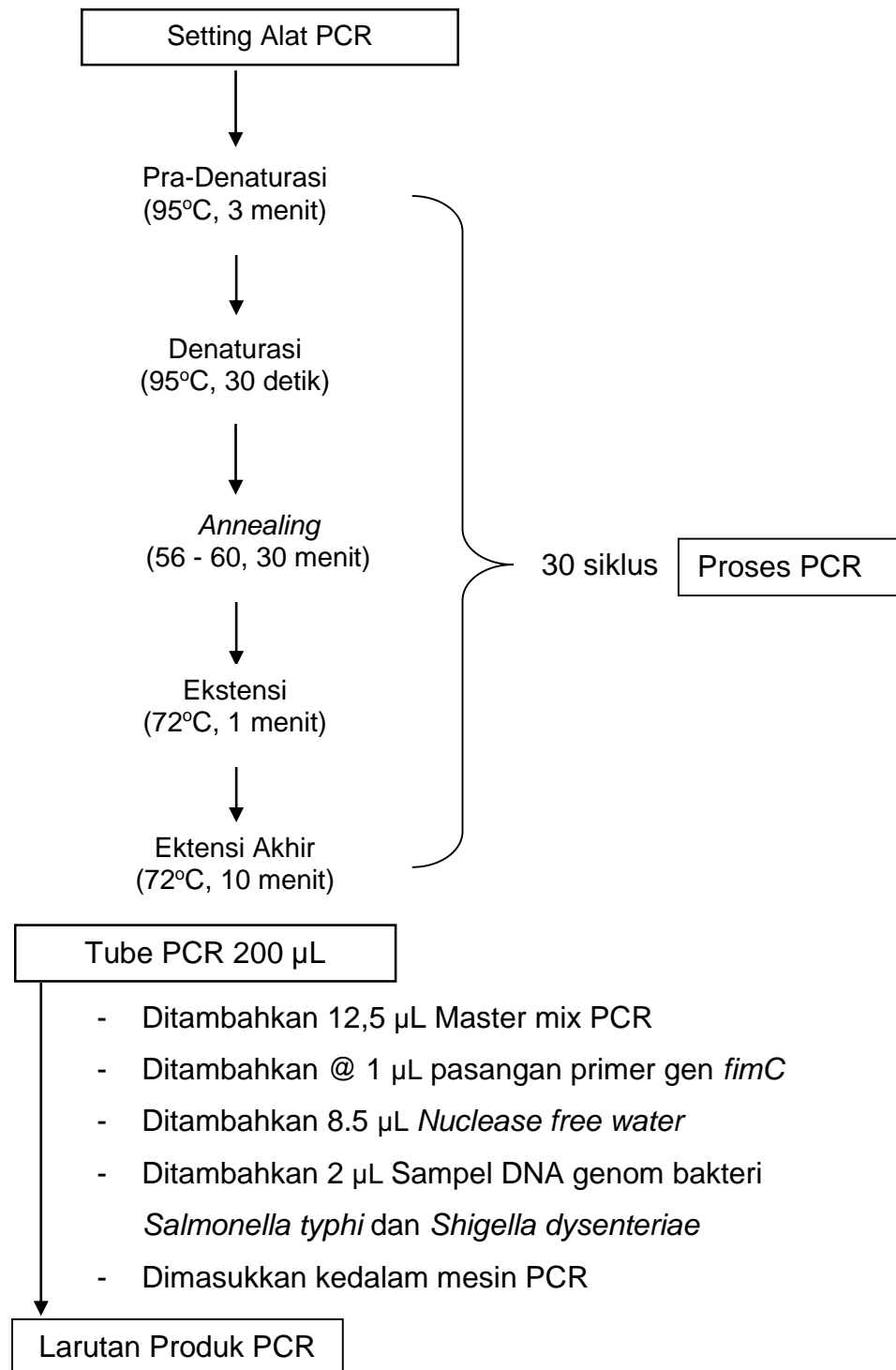


E.3. Perancangan Primer Gen *fim-C* *S. Typhi* dan *S. dysenteriae*



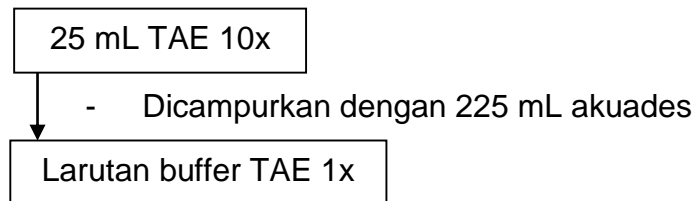
E.4. Optimasi Suhu Annealing PCR Pasangan Primer dengan *Template Salmonella typhi* dan *Shigella dysenteriae*

4.1. Proses PCR

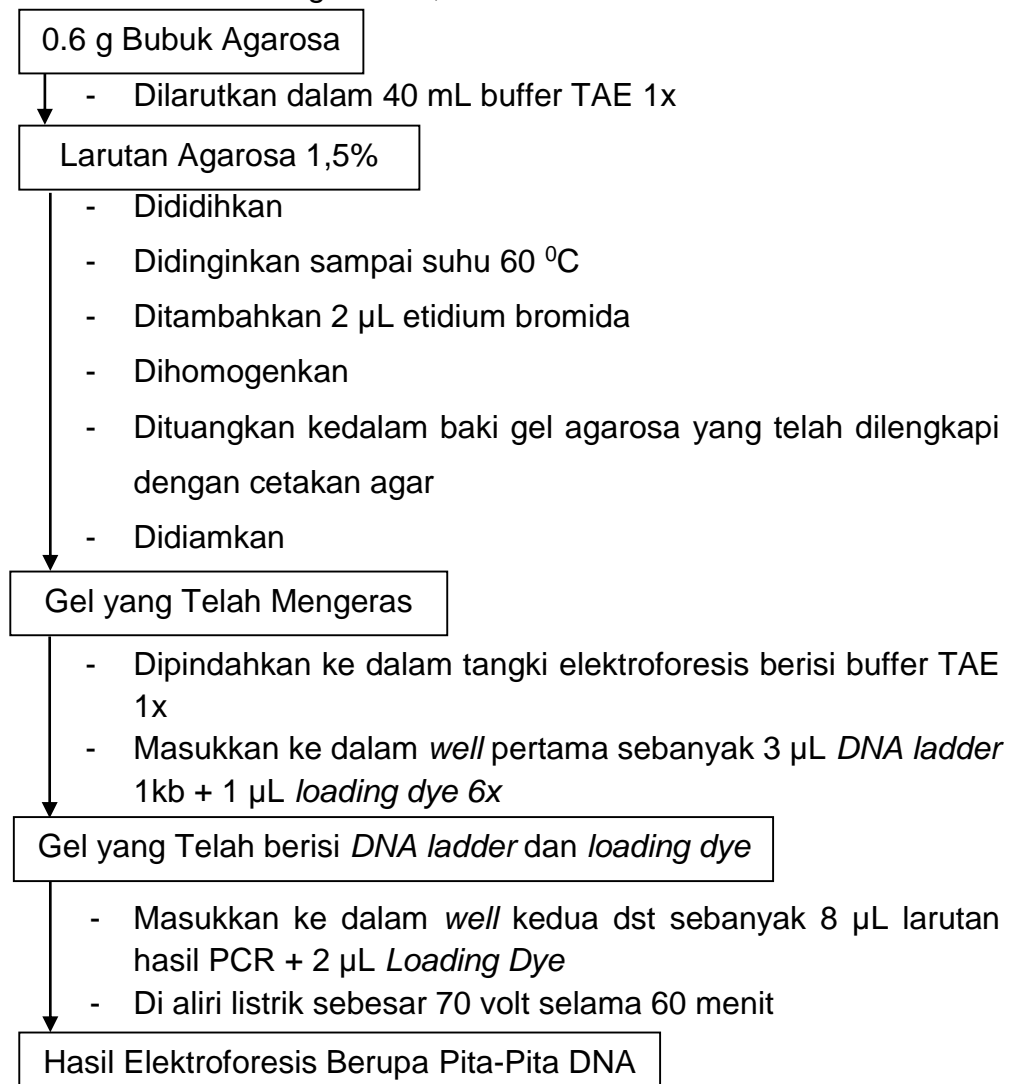


E.5. Tahapan Elektroforesis

5.1. Pembuatan buffer Tris Asetat EDTA (TAE) 1x



5.2. Pembuatan Gel Agarosa 1,5% dan Proses Elektroforesis



Lampiran 2.

Salmonella enterica subsp. enterica serovar Typhi str. CT18, complete genome

NCBI Reference Sequence: NC_003198.1

LOCUS NC_003198 693 bp DNA linear CON 28-OCT-2016
DEFINITION Salmonella enterica subsp. enterica serovar Typhi str. CT18, complete genome.
ACCESSION NC_003198 REGION: 597283..597975
VERSION NC_003198.1
DBLINK BioProject: PRJNA57793
Sequence Read Archive: ERS000058
Assembly: GCF_000195995.1
KEYWORDS RefSeq; complete genome.
SOURCE Salmonella enterica subsp. enterica serovar Typhi str. CT18
ORGANISM Salmonella enterica subsp. enterica serovar Typhi str. CT18
Bacteria; Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Enterobacteriales; Enterobacteriaceae; Salmonella.
REFERENCE 1 (bases 1 to 693)
AUTHORS Parkhill, J., Dougan, G., James, K.D., Thomson, N.R., Pickard, D., Wain, J., Churcher, C., Mungall, K.L., Bentley, S.D., Holden, M.T., Sebaihia, M., Baker, S., Basham, D., Brooks, K., Chillingworth, T., Connerton, P., Cronin, A., Davis, P., Davies, R.M., Dowd, L., White, N., Farrar, J., Feltwell, T., Hamlin, N., Haque, A., Hien, T.T., Holroyd, S., Jagels, K., Krogh, A., Larsen, T.S., Leather, S., Moule, S., O'Gaora, P., Parry, C., Quail, M., Rutherford, K., Simmonds, M., Skelton, J., Stevens, K., Whitehead, S. and Barrell, B.G.
TITLE Complete genome sequence of a multiple drug resistant Salmonella enterica serovar Typhi CT18
JOURNAL Nature 413 (6858), 848-852 (2001)
PUBMED 11677608
REFERENCE 2 (bases 1 to 693)
CONSRTM NCBI Genome Project
TITLE Direct Submission
JOURNAL Submitted (10-SEP-2013) National Center for Biotechnology

Information, NIH, Bethesda, MD 20894, USA

REFERENCE 3 (bases 1 to 693)

AUTHORS Parkhill, J.

TITLE Direct Submission

JOURNAL Submitted (25-OCT-2001) Submitted on behalf of the Salmonella sequencing team, Sanger Centre, Wellcome Trust Genome Campus, Hinxton, Cambridge CB10 1SA, UK

COMMENT REVIEWED REFSEQ: This record has been curated by NCBI staff. The reference sequence is identical to AL513382.

RefSeq Category: Reference Genome

CLI: Clinical Isolate

E-mail: parkhill@sanger.ac.uk

Notes: Details of *S. typhi* sequencing at the Sanger Centre are available on the World Wide Web.

(URL, http://www.sanger.ac.uk/Projects/S_typhi/).

COMPLETENESS: full length.

FEATURES

	Location/Qualifiers
source	1..693
	/organism="Salmonella enterica subsp. enterica serovar Typhi str. CT18"
	/mol_type="genomic DNA"
	/strain="CT18"
	/serovar="Typhi"
	/sub_species="enterica"
	/db_xref="taxon:220341"
gene	1..693
	/gene="fimC"
	/locus_tag="STY0592"
	/db_xref="GeneID:1247059"
CDS	1..693
	/gene="fimC"
	/locus_tag="STY0592"
	/codon_start=1
	/transl_table=11
	/product="fimbrial chaperone protein"
	/protein_id="NP_455134.1"
	/db_xref="GeneID:1247059"

/translation="MLNSIKLGFIVLLTLFTSLNVQAAGGIA
 LGATRVIYPSAAKQTS LAISNSDTQERYLVNSWIENNAGQKE
 KTFIVTPPLFVSEPKSENTLR I IYAGQPLPEDRESLFWMNVK
 AIPSVDKSHIEGKNVLQLAILSR IKLFVRPANLPQTPEDAPT
 LLKFSRVGNHLKITNPSAYYLT LVNISVGAKKIDNVMIAPKS
 DMQIPLPTGAQGSVTFQTVNDYGALTSATTASLG"

ORIGIN

```

1 atgctgaatagtataaaattaggatttattgttcttctcacgttatttacttcgctgaac
61 gtacagggcgcggggggggattgcattaggcgccacgcgtgttatttatccctcggcgcg
121 aaacagacttctcttggaatcagtaatagcgatactcaagaacgttacctcgtcaattca
181 tggatcgaaaataacgctgggcagaaagaaaaaacgtttatcgttacgccgcctttattc
241 gtcagcgagcccaaaagtgaaaacacgctgcgtattatctacgccgggcaaccgctaccc
301 gaggatcgggagtcggttattctggatgaacgtgaaagccatcccgtcggtcgataaaagt
361 catattgaaggaaaaaacgttctgcaactggcgattctgtcgcgcacaaactgttcgtg
421 cgtccggcggaatttgccgcagacgccggaagacgcgcgcaccttgctgaaattttcccg
481 gtcgggaaccatctcaagataaccaacccatctgcttattacctcacgctggtcaatatc
541 agcgtgggtgcgaaaaagattgataacgtgatgatcgcgccaaaaagcgacatgcaaatt
601 cccttaccgactggcgcgagggcagcgtgacatttcagaccgtcaatgattacggcgca
661 ttgacgtcggcgacaacagccagtctcggttaa

```

Lampiran 3.

Shigella dysenteriae Sd197 chromosome, complete genome

NCBI Reference Sequence: NC_007606.1

LOCUS NC_007606 696 bp DNA linear CON 03-AUG-2016

DEFINITION Shigella dysenteriae Sd197 chromosome, complete genome.

ACCESSION NC_007606 REGION: complement(614951..615646)

VERSION NC_007606.1

DBLINK BioProject: PRJNA58213
Assembly: GCF_000012005.1

KEYWORDS RefSeq.

SOURCE Shigella dysenteriae Sd197
ORGANISM Shigella dysenteriae Sd197
Bacteria; Proteobacteria; Gammaproteobacteria;
Enterobacterales;Enterobacteriaceae; Shigella.

REFERENCE 1 (bases 1 to 696)
AUTHORS Yang,F., Yang,J., Zhang,X., Chen,L., Jiang,Y., Yan,Y.,
Tang, X.,Wang,J., Xiong,Z., Dong,J., Xue,Y., Zhu,Y.,
Xu,X., Sun,L., Chen,S., Nie,H., Peng,J., Xu,J.,
Wang,Y., Yuan,Z., Wen,Y., Yao,Z., Shen,Y., Qiang,B.,
Hou,Y., Yu,J. and Jin,Q.
TITLE Genome dynamics and diversity of Shigella species, the
etiologic agents of bacillary dysentery
JOURNAL Nucleic Acids Res. 33 (19), 6445-6458 (2005)
PUBMED 16275786
REMARK Publication Status: Online-Only

REFERENCE 2 (bases 1 to 696)
CONSRM NCBI Genome Project
TITLE Direct Submission
JOURNAL Submitted (30-NOV-2005) National Center for
Biotechnology
Information, NIH, Bethesda, MD 20894, USA

REFERENCE 3 (bases 1 to 696)
AUTHORS Jin,Q., Yang,F., Yang,J., Jiang,Y., Yan,Y., Chen,L.,
Zhang,X., Peng,J., Tang,X., Xiong,Z., Nie,H., Dong,J.,
Xue,Y., Xu,X., Zhu,Y., Shen,Y., Qiang,B. and Hou,Y.
TITLE Direct Submission
JOURNAL Submitted (29-OCT-2004) State Key Laboratory for
Moleclular Virology and Genetic Engineering, Microbial
Genome Center of Chinese Ministry of Public Health, 6
Rongjing Eastern Street, BDA, Beijing 100176, P. R.
China

COMMENT REVIEWED REFSEQ: This record has been curated by NCBI
staff. The reference sequence was derived from
CP000034.
RefSeq Category: Reference Genome
UPR: UniProt Genome

COMPLETENESS: full length.

FEATURES	Location/Qualifiers
source	1..696 /organism="Shigella dysenteriae Sd197" /mol_type="genomic DNA" /strain="Sd197" /serotype="1" /db_xref="taxon:300267"
mobile_element	complement(<1..140) /mobile_element_type="insertion sequence:iso-IS1"
gene	complement(<1..78) /locus_tag="SDY_0562a" /db_xref="GeneID:18262969"
CDS	complement(<1..78) /locus_tag="SDY_0562a" /codon_start=1 /transl_table=11 /product="insertion element iso-IS1N protein InsA" /protein_id="YP_009000655.1" /db_xref="GeneID:18262969" /translation="MASVNIHCPRCQSAQVYRHGQNPKGHDRFR CRDCHRVFQLTYTYEARPGIKELITEMAFNGAGVRDTARTLK IGINTVIRTLKNSRQSE"
gene	1..696 /gene="ybgP" /locus_tag="SDY_0652" /note="SDY0652" /db_xref="GeneID:3799716"
CDS	1..696 /gene="ybgP" /locus_tag="SDY_0652" /note="Code: NU; COG: COG3121" /codon_start=1 /transl_table=11 /product="chaperone" /protein_id="YP_402330.1" /db_xref="GeneID:3799716" /translation="MAFRVLTMAVDLCRLTTRTMNVNAGHERTS KSRIIHQIQLIRGITENЕКGEKSDEFLVALPPIQRLEPKATS QVRIMQAATAKVPTDRESLFYYNLREIPPVPEGSEGHAILQ VAVQSRIKLFWRPAALRKKMGDHVEQQQLQVSQQNNQLTLKNP TGYYLTIAYLGRDEKGVLPFGKSTMVAPFSSVTTSTGSYSGK QFYLGYYDDYGALRMNTLSCQRQCRLQPVENKK"
gene	693..>696 /gene="ybgO" /locus_tag="SDY_0651" /note="SDY0651"

CDS

```

/db_xref="GeneID:3799715"
693..>696
/gene="ybgO"
/locus_tag="SDY_0651"
/codon_start=1
/transl_table=11
/product="hypothetical protein"
/protein_id="YP_402329.1"
/db_xref="GeneID:3799715"
/translation="MRFAGVLLAICLIFLPLKAALALNCYFGT
ENGAVEKSEAIMPFAVPANSKPGDKIWESDDIKIPVYCDNNT
NGNFESEHVYAWVNPYPGIQDPYYQLGVTYEGVDYDASLGKS
RIDTNQCIDSKNIDIYTPEQIIAMGWQNKLCSGDPTVMHKSR
TFVARMRLYVKVRAMPHPHDYQSKLSDYIVVQFDGAGSVNEDP
TAKNLKYHITGLENIRVLDCSVNFAISPETQVVDFGRFNVLD
IRRHTMSQQFKITTTKSQNDQCTDGFKVSSSFYTDETLIDED
KSL LIGNGLKLRLLDENASPYTFNKYSEYADFTSDLLVYEKT
YTAELSSTPG TPIDVGPFDTVVLFKINYN"

```

ORIGIN

```

1  atggccttttagggttctgaccatggcggtagacctgtgcagactgacaacgaggacaatg
61  aatgttaacgctggccatgaaagaacctcaaaatcccgcattatacatcagattcaacta
121 attagaggcatcacccgaaaatgaaaaggagagaaaaagcgatgaatttctcgtcgccctg
81  ccgcctatccagcgactggagccaaaagcgacttcgcaggttcggatcatgaaacaagcc
241 gccaccgcgaaagtacccaccgatcgcgaaatctctcttttactataacctgcgtgaaatt
301 ccgcctgtcccgaaggcagcgagggccatgcgatcctgcaagtcgccgtccaaagtcgc
361 attagctattctggcgcccgccgcattacgcataaaaaaatgggcgatcatgttgagcaa
421 cagctacaggttagccagcagaataaccagcttaccctgaaaaacccgaccggatactat
481 ctgactattgcctatcttgggcgggatgagaaaggcgctgctgcctggctttaaagcacg
541 atggctcgacacgttcagttcggtcaccaccagcacgggcagctatagcggaagcagttt
601 tatcttggctacatggacgactacggcgcatcggtatgaacacgctctcctgccagcgg
661 caatgccgcctgcagccggtggagaataaaaaatga

```

SURAT PERNYATAAN KEASLIAN SKRIPSI

Saya yang bertanda tangan di bawah ini, mahasiswa Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Negeri Jakarta :

Nama : Dini Nurkhasanah

Nomor Registrasi : 3325120248

Jurusan : Kimia

Program Studi : Kimia

menyatakan bahwa skripsi yang saya buat dengan judul "**Isolasi, Amplifikasi dan Karakterisasi Gen *fim-C* Bakteri *Salmonella typhi* dan *Shigella dysenteriae***" adalah :

1. Dibuat dan diselesaikan oleh saya sendiri berdasarkan data yang diperoleh dari hasil penelitian pada bulan Februari 2016 – Januari 2017.
2. Bukan merupakan duplikat skripsi yang pernah dibuat oleh orang lain atau jiplakan karya tulis orang lain dan bukan terjemahan karya tulis orang lain.

Pernyataan ini saya buat dengan sebenar-benarnya dan saya bersedia menanggung segala akibat yang timbul jika pernyataan saya tidak benar.

Jakarta, 12 Februari 2017

Yang membuat pernyataan,




Dini Nurkhasanah

DAFTAR RIWAYAT HIDUP



DINI NURKHASANAH dilahirkan pada tanggal 18 Februari 1994 di kota Jakarta, DKI Jakarta. Penulis merupakan anak pertama dari tiga bersaudara dari pasangan Bapak Kwatno dan Ibu bernama Sarpiyah, serta mempunyai dua adik bernama Hannisa Subekti dan Maulidia Husna.

Pendidikan formal yang pernah ditempuh penulis adalah TK Islam Nahdatul Wathan, SDN Aren Jaya X, SMP Negeri 11 Bekasi dan SMA PGRI 1 Bekasi. Penulis melanjutkan pendidikan program studi S1 Jurusan Kimia di Universitas Negeri Jakarta.

Penulis pernah melakukan kunjungan ke beberapa industri, seperti PT. Niramas Utama (INACO), PT. Coca Cola Amatil Indonesia, PT. Amerta Indah Otsuka (Pocari Sweat), PT. Yakult Indonesia Persada, PT. Sidomuncul, dan Pabrik Carica – Dieng, Wonosobo. Penulis juga pernah melakukan Kuliah Kerja Nyata (KKN) di Desa Sukamulya, Subang. Selain itu penulis pernah menjadi asisten dosen Praktikum Kimia Dasar I dan Mikrobiologi.