

SUBKLONING DAN EKSPRESI Gen *fim-C S. typhimurium*

Ulfah Choiriyah, Muktiningsih Nurjayadi, dan Fera Kurnia Dewi
Jurusan Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Negeri Jakarta, Jl. Pemuda No. 10, Rawamangun, Jakarta, Indonesia.

Corresponding Author: *fahchoiriyah03@gmail.com (Ulfah Choiriyah)*

Abstrak

Penelitian ini bertujuan untuk memperoleh rekombinan pET-30a-*fim-C S. typhimurium* hasil subkloning dan protein rekombinan Fim-C *S. typhimurium* hasil ekspresi serta mengetahui karakter subklon rekombinan dan protein rekombinan yang dihasilkan.

Metode yang digunakan adalah eksplorasi. Plasmid rekombinan pGEM-T-easy-*fim-C S. typhimurium* dari penelitian sebelumnya dipotong dengan dua enzim restriksi yaitu BamHI dan HindIII. Gen *fim-C S. typhimurium* tersebut diligasi pada vektor ekspresi pET-30a dan ditransformasi dengan sel inang *E. coli* TOP-10F' untuk memperoleh plasmid pET-30a-*fim-C S. typhimurium*. Hasil rekombinan dikarakterisasi dengan metode size screening, PCR koloni, analisis enzim restriksi dan sekuensing untuk mengetahui keberhasilan transformasi yang dilakukan.

Hasil karakterisasi menunjukkan pET-30a-*fim-C S. typhimurium* mengandung sisipan gen *fim-C S. typhimurium* berukuran 0,7 kb homolog 100% dengan *S. typhimurium* str. Lt2 pada GeneBank. Plasmid rekombinan pET-30a-*fim-C S. typhimurium* ditransformasi dengan sel inang *E. coli* ArcticExpress (DE3) yang memiliki sistem transkripsi dan translasi sehingga diperoleh protein rekombinan. Overekspresi menghasilkan protein yang tidak larut dalam sitoplasma atau membentuk inclusion bodies. Protein rekombinan Fim-C *S. typhimurium* dikarakterisasi dengan SDS-PAGE sehingga diperoleh pita overekspresi protein pada ukuran diantara 25 kDa dan 35 kDa. Hasil ini diperkuat dengan analisis menggunakan program DNASTar menunjukkan ukuran protein rekombinan Fim-C *S. typhimurium* sebesar 31 kDa.

Dari penelitian ini disimpulkan bahwa subkloning dan ekspresi gen *fim-C S. typhimurium* telah berhasil dilakukan yang akan digunakan pada penelitian selanjutnya.

Kata kunci: *Salmonella typhimurium*, gen *fim-C S. typhimurium* 0,7 kb, subkloning gen *fim-C S. typhimurium*, ekspresi gen *fim-C S. typhimurium*, protein rekombinan Fim-C *S. typhimurium* 31 kDa

Abstract

This research aims to obtain pET-30a-fim-C S. typhimurium recombinant from subcloning results and Fim-C S. typhimurium recombinant protein from expression results and to know characters recombinant subclone and recombinant protein produced.

This research is exploration. Steps of this research are pGEM-T-easy-fim-C S. typhimurium recombinant plasmid from previous research is cut with two restriction enzymes, BamHI dan HindIII. fim-C S. typhimurium gene is ligated to the expression vector pET-30a and transformed with E. coli TOP-10F' as host cell to obtain pET-30a-fim-C S. typhimurium plasmid. The recombinant results is characterized by size screening, PCR colony, restriction enzymes analysis and sequencing method to know the successful transformation performed.

Characterization shows that pET-30a-fim-C S. typhimurium contain fim-C 0,7 kb of S. typhimurium gene insert have 100% homology with S. typhimurium str. Lt2 in GeneBank. pET-30a-fim-C S. typhimurium recombinant plasmid is transformed to E. coli ArcticExpress (DE3) as host cell which has transcription and translation system so that obtained recombinant protein. Overexpression produces insoluble protein in the cytoplasm or forming inclusion bodies. Fim-C S. typhimurium recombinant protein is characterized by SDS-PAGE so that obtained overexpression protein band size between 25 kDa and 35 kDa. These results were confirmed by analysis using DNASTAR's program that shows the size of Fim-C S. typhimurium recombinant protein is 31 kDa. From this research, we can concluded that subcloning and expression fim-C S. typhimurium gene has been successfully and this protein can be used in further research.

Keyword: Salmonella typhimurium, fim-C 0,7 kb of S. typhimurium gene, subcloning fim-C S. typhimurium gene, expression fim-C S. typhimurium gene, Fim-C 31 kDa of S. typhimurium recombinant protein

1. Pendahuluan

Salmonella typhimurium (*S. typhimurium*) merupakan bakteri yang hidup di saluran pencernaan manusia maupun hewan. *S. typhimurium* pada manusia dapat menyebabkan gastroenteritis, sedangkan pada hewan (mencit) dapat menyebabkan *typhus*. *Typhus* yang terjadi pada mencit menunjukkan gejala yang mirip dengan *typhus* pada manusia, yaitu ketika mencit terinfeksi bakteri *S. typhimurium* [1]. Saat ini *S. typhimurium* sedang dipelajari dalam pengembangan vaksin untuk penyakit *typhus* pada manusia. Hal ini sangat penting dilakukan, karena penyakit *typhus* merupakan penyakit yang tersebar hampir di seluruh dunia dan merupakan penyakit endemik yang sering dijumpai di negara-negara berkembang.

Salah satu inovasi vaksin yang sedang diteliti adalah vaksin rekombinan. Vaksin rekombinan adalah vaksin yang diproduksi dari suatu gen tertentu yang bersifat potensial dan diproduksi dengan teknologi rekayasa genetika [2,3]. Salah satu gen yang berpotensi sebagai kandidat vaksin rekombinan adalah gen *fim-C*. Gen *fim-C* merupakan gen yang mengkode protein *fimbriae*. *Fimbriae* merupakan protein permukaan yang terdapat pada *Salmonella typhimurium*. *Fimbriae* adalah bagian tubuh yang digunakan oleh bakteri *S. typhimurium* untuk menempelkan dirinya pada sel inang dan objek lainnya [3,4].

Pada penelitian sebelumnya [5] telah diperoleh plasmid rekombinan pGEM-T-*easy-fim-C S. typhimurium* yang mengandung sisipan gen *fim-C S. typhimurium* dengan ukuran 0,7 kilobasa (kb). Pada penelitian ini akan dilakukan subkloning gen *fim-C S. typhimurium* 0,7 kb pada vektor ekspresi pET-30a dengan sel inang *E. coli* TOP-10F' dan *E. coli* ArcticExpress (DE3) serta ekspresi gen *fim-C S. typhimurium* untuk memperoleh protein rekombinan *Fim-C S. typhimurium* yang akan digunakan sebagai model dalam

pengembangan vaksin rekombinan untuk penyakit *typhus* pada manusia.

2. Metodologi Penelitian

Metode yang digunakan dalam penelitian ini adalah eksplorasi yang terdiri dari beberapa tahapan meliputi: (1) Rekonstruksi plasmid rekombinan pGEM-T-*easy-fim-C S. typhimurium* yang mengandung gen *fim-C S. typhimurium*; (2) Subkloning gen *fim-C S. typhimurium* pada vektor ekspresi pET-30a; (3) Transformasi plasmid rekombinan pET-30a-*fim-C S. typhimurium* ke sel inang *E. coli* TOP-10F'; (4) Karakterisasi plasmid rekombinan pET-30a-*fim-C S. typhimurium* yang mengandung gen *fim-C S. typhimurium* 0,7 kb; (5) Transformasi plasmid rekombinan ke sel inang *E. coli* ArcticExpress (DE3); (6) Ekspresi, isolasi dan karakterisasi protein rekombinan *Fim-C S. typhimurium*.

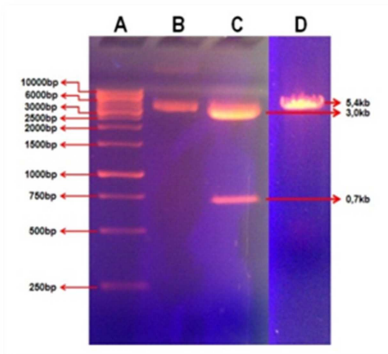
Rekonstruksi plasmid rekombinan pGEM-T-*easy-fim-C S. typhimurium* yang diperoleh dari penelitian sebelumnya [5] dilakukan dengan dua tahapan yang dilakukan secara paralel, yaitu penyiapan sisipan gen *fim-C S. typhimurium* serta vektor ekspresi pET-30a untuk konstruksi plasmid rekombinan pada vektor ekspresi. Penyiapan sisipan gen *fim-C S. typhimurium* dilakukan dengan cara memotong plasmid rekombinan pGEM-T-*easy-fim-C S. typhimurium* dengan dua enzim restriksi yaitu *Bam*HI dan *Hind*III. Penyiapan vektor ekspresi pET-30a dilakukan dengan cara memotong plasmid vektor pET-30a sirkular dengan enzim yang sama untuk memotong sisipan gen yaitu enzim *Bam*HI dan *Hind*III, sehingga hasil pemotongan kedua molekul tersebut bersifat kompatibel dan dapat diligasi oleh enzim *T4-Ligase*. Hasil pemotongan plasmid rekombinan pGEM-T-*easy-fim-C S. typhimurium* dan plasmid vektor pET-30a dielektroforesis menggunakan elektroforesis gel agarose 1%.

Konstruksi dan subkloning plasmid rekombinan pET-30a-*fim-C S. typhimurium*

Tabel 1 Hasil Pengukuran Absorbansi Larutan Standar *Bovin Serum Albumin* (BSA) dan Protein Rekombinan.

[BSA] (µg/mL)	A ₅₉₅			Rata-rata
	I	II	III	
0	0	0	0	0
1	0,039	0,032	0,033	0,035
2	0,077	0,079	0,086	0,081
4	0,148	0,149	0,154	0,150
6	0,219	0,219	0,215	0,218
8	0,280	0,284	0,285	0,283
10	0,326	0,329	0,331	0,329
12	0,370	0,381	0,384	0,378
14	0,434	0,466	0,429	0,431
Protein pellet (pengenceran 20x)	0,376	0,381	0,391	0,383

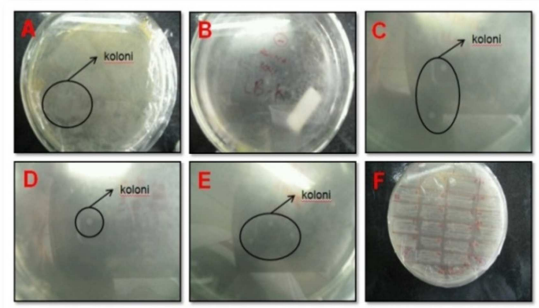
dilakukan dengan beberapa tahap yaitu ligasi sisipan gen *fim-C S. typhimurium* dengan vektor ekspresi pET-30a dan transformasi sel inang *E. coli* TOP-10F' dengan hasil ligasi. Reaksi ligasi dilakukan berdasarkan prosedur kit vektor pET-30a. Pada tahap ligasi ini digunakan enzim T4 DNA *ligase* untuk meligasi fragmen DNA insert ke dalam vektor.



Gambar 1 Hasil Pemotongan Plasmid Rekombinan pGEM-T-*easy-fim-C S. typhimurium* dan Plasmid Vektor pET-30a.

- Lajur A : 1 kb DNA ladder (marker).
- Lajur B : plasmid rekombinan pGEM-T-*fim-C S. typhimurium* (*uncut*).
- Lajur C : plasmid rekombinan pGEM-T-*fim-C S. typhimurium* dipotong *Bam*HI dan *Hind*III.
- Lajur D : plasmid vektor pET-30a dipotong *Bam*HI dan *Hind*III.

Gen *fim-C S. typhimurium* hasil rekonstruksi plasmid rekombinan pGEM-T-*easy-fim-C S. typhimurium* dipurifikasi kemudian dijadikan sebagai sisipan (*insert*) dalam proses ligasi ke vektor ekspresi yaitu pET-30a. Vektor pET-30a ini diisolasi menggunakan *High-Speed Pasmid Mini Kit* (Geneaid). Ligasi dilakukan semalam dalam suhu 4°C. Setelah dilakukan ligasi terhadap sisipan gen *fim-C S. typhimurium* dengan vektor ekspresi pET-30a, maka dilakukan transformasi sel inang *E. coli* TOP-10F' dengan hasil ligasi tersebut. Tahap transformasi diawali dengan penyiapan sel kompeten *E. coli* TOP-10F' dan dilanjutkan dengan proses transformasi sel inang *E. coli* TOP-10F' dengan metode *heat shock*. *E. coli* TOP-10F' diberi kejutan dengan suhu dingin dan suhu panas secara bergantian, hal ini dilakukan agar dinding selnya mengembang dan mengempis secara cepat sehingga memungkinkan DNA dari luar masuk ke dalam sel. Hasil transformasi ditumbuhkan dalam media LB padat yang mengandung kanamisin.

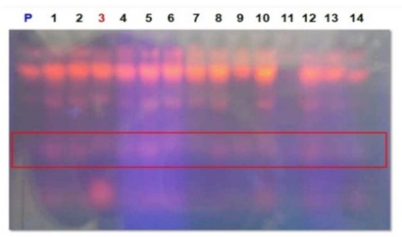


Gambar 2 Hasil Transformasi Plasmid Rekombinan pET-30a-*fim-C S. typhimurium* pada Sel Inang *E. coli* TOP-10F'.

- A : Kontrol positif yaitu plasmid vektor pET-30a (500 koloni).
- B : Kontrol negatif yaitu sel kompeten *E. coli* TOP-10F' (tidak tumbuh).
- C : Sel inang yang ditransformasikan dengan plasmid rekombinan dengan perbandingan ligasi 1:1 (7 koloni).
- D : Sel inang yang ditransformasikan dengan plasmid rekombinan dengan perbandingan ligasi 1:3 (7 koloni).

- E : Sel inang yang ditransformasikan dengan plasmid rekombinan dengan perbandingan ligasi 1:5 (11 koloni).
 F : Biakan koloni hasil transformasi pET-30a-*fim-C* *S. typhimurium* pada perbandingan 1:1, 1:3 dan 1:5.

Koloni dari plasmid rekombinan pET-30a-*fim-C* *S. typhimurium* yang dihasilkan kemudian dikarakterisasi dengan beberapa metode. Metode karakterisasi yang dilakukan meliputi *size screening*, PCR koloni, analisis enzim restriksi dan sekuensing (*sequencing*). Karakterisasi ini dilakukan untuk memastikan keberhasilan konstruksi dan subkloning yang dilakukan. *Size screening* yang dilakukan menggunakan *Rapid Disruption Solution* (5 mM EDTA; 10% *sucrose*; 0,25% SDS; 100 mM NaOH; 60 mM KCl; 0,5% BB) untuk menghancurkan sel (lisis) sehingga diperoleh plasmid rekombinan. Hasil *size screening* dielektroforesis dengan elektroforesis gel agarosa 1%. Teknik PCR dilakukan menggunakan primer *fim-C*-Stpm-F dan primer *fim-C*-Stpm-R. Setelah diketahui bahwa klon rekombinan pET-30a-*fim-C* *S. typhimurium* mengandung sisipan gen *fim-C* *S. typhimurium* maka dilakukan isolasi plasmid dilakukan dengan *High-Speed Plasmid Kit* (Geneaid).

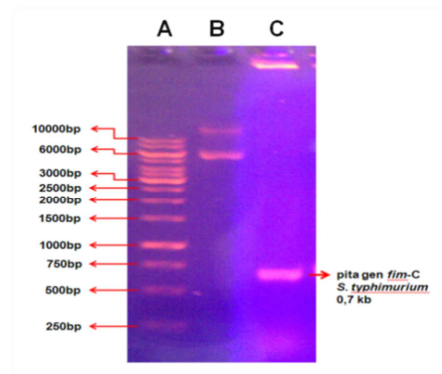


Gambar 3 Hasil *Size Screening* Koloni pET-30a-*fim-C* *S. typhimurium*.

- Lajur P : kontrol positif (sel inang dengan transformasi plasmid pET-30a).
 Lajur 1-14 : koloni 1-14.

Hasil isolasi plasmid rekombinan pET-30a-*fim-C* *S. typhimurium* divisualisasikan dengan elektroforesis gel agarosa 1%. Plasmid hasil isolasi ini kemudian dianalisa dengan analisis enzim restriksi menggunakan enzim restriksi *Bam*HI dan *Hind*III dan juga disekuensing di

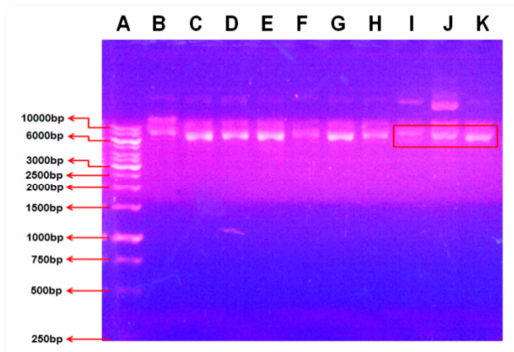
Lab Macrogen (Korea) untuk lebih memastikan keberhasilan konstruksi pET-30a-*fim-C* *S. typhimurium*.



Gambar 4 Hasil Amplifikasi dengan Pasangan Primer *fim-C*-Stpm-F dan Primer *fim-C*-Stpm-R.

- Lajur A : 1 kb DNA ladder (marker).
 Lajur B : plasmid pET-30a (tanpa sisipan gen).
 Lajur C : plasmid rekombinan pET-30a-*fim-C* *S. typhimurium*-(3).

Selanjutnya dilakukan transformasi plasmid rekombinan pET-30a-*fim-C* *S. typhimurium* hasil isolasi yang telah dikarakterisasi, sehingga telah dipastikan plasmid rekombinan tersebut mengandung sisipan gen *fim-C* *S. typhimurium*. Sel inang yang digunakan untuk transformasi ini adalah *E. coli* ArcticExpress (DE3) yang berfungsi untuk transkripsi dan translasi. Transformasi dilakukan dengan metode *heat shock* seperti transformasi yang dilakukan dengan sel inang *E. coli* TOP-10F'. Rekombinan pET-30a-*fim-C* *S. typhimurium* dalam sel inang *E. coli* ArcticExpress (DE3) hasil transformasi kemudian dibiakkan di dalam media LB cair yang mengandung kanamisin untuk overekspresi. Prosedur overekspresi sesuai dengan manual instruksi ekspresi dengan bakteri *E. coli* ExpressArctic (DE3) dari Agilent Technologies. Hasil overekspresi dianalisis dengan elektroforesis SDS-PAGE 12%. Protein *Fim-C* yang dihasilkan diisolasi dan diukur dengan metode *Bradford* menggunakan *Spectrophotometer Thermo Scientific Genetic* (Genesys) secara kuantitatif dengan panjang gelombang 595.



Gambar 5 Hasil Isolasi Plasmid Rekombinan pET-30a-*fim-C S. typhimurium*.

Lajur A : 1 kb DNA ladder (marker).

Lajur B : plasmid pET-30a. Lajur C-H: plasmid rekombinan pET-30a-*fim-C S. typhi*.

Lajur I-K : plasmid rekombinan pET-30a-*fim-C S. typhimurium*-(3).

3. Hasil dan Pembahasan

Penelitian ini bertujuan untuk memperoleh plasmid rekombinan pET-30a-*fim-C S. typhimurium* dan protein rekombinan *Fim-C S. typhimurium* sebagai model dalam pengembangan vaksin rekombinan untuk penyakit *typhus*.

Rekonstruksi plasmid rekombinan pGEM-T-easy-*fim-C S. typhimurium*

Dari hasil pemotongan (Gambar 1) dapat dilihat bahwa pada lajur B terdapat dua pita yang menunjukkan bahwa plasmid rekombinan pGEM-T-easy-*fim-C S. typhimurium* berbentuk sirkular. Kemudian pada lajur C terdapat dua pita pada dua posisi yaitu pita 0,7 kb dan 3,0 kb, dimana pita yang lebih rendah yaitu 0,7 kb adalah posisi gen *fim-C* 0,7 kb sebagai *insert* dan pita yang lebih tinggi yaitu 3,0 kb adalah posisi plasmid pGEM-T-easy sebagai vektor kloning. Pada lajur D menunjukkan pemotongan plasmid pET-30a yang juga dipotong oleh dua enzim yang sama menghasilkan satu pita pada ukuran 5,4 kb. Pada pemotongan plasmid pET-30a seharusnya menghasilkan dua pita, satu pita lain yang seharusnya terlihat berukuran sangat kecil sehingga pita tersebut tidak

tampak pada hasil elektroforesis. Akan tetapi jumlah pita pada Lajur D yang hanya satu pita tersebut sudah menunjukkan bahwa plasmid vektor pET-30a linier (sudah tidak sirkular) karena telah berhasil dipotong oleh enzim *BamH* I dan *Hind* III.

Subkloning gen *fim-C S. typhimurium* pada vektor ekspresi pET-30a

Faktor yang sangat berperan dalam proses ligasi adalah enzim ligase. Enzim ligase adalah enzim yang berfungsi menggabungkan fragmen DNA yang telah dipotong dengan enzim restriksi dengan fragmen DNA *vector* [6]. Enzim ligase hanya dapat menggabungkan fragmen DNA yang mempunyai ujung tidak rata (*sticky end*) yang saling berkomplemen dan ujung rata (*blunt end*). Enzim ligase mengkatalisasi pembentukan ikatan kovalen antara gula dengan fosfat dari nukleotida yang berdekatan, yang menghendaki satu nukleotida mempunyai ujung 5' fosfat bebas dan nukleotida yang berdekatan mempunyai ujung 3' gugus hidroksil. Enzim ligase tidak membedakan DNA-DNA dari organisme yang berbeda. Oleh karena itu, dua fragmen DNA dari organisme yang berbeda pun dapat digabungkan oleh enzim ini. Kedua fragmen ini kemudian menjadi satu molekul DNA yang disebut sebagai DNA rekombinan. DNA rekombinan ini tidak dapat dilihat keberhasilannya kecuali dengan memperbanyaknya di dalam sel inang. Proses ini disebut sebagai transformasi atau kloning gen [6].

Ligasi berhasil bila kedua ujung yang akan disambungkan berkomplemen. Kecocokan yang sangat spesifik dibutuhkan bila fragmen DNA yang akan disambungkan mempunyai ujung tidak rata (*sticky end*), karena penyambungannya harus mengikuti kaidah Chargaff, yaitu T berpasangan dengan A dan G berpasangan dengan C. Sedangkan fragmen DNA yang mempunyai ujung rata (*blunt end*) dapat disambungkan dengan sembarang

fragmen DNA lain yang berujung rata. Oleh karena itu untuk mengklon suatu fragmen DNA yang spesifik menggunakan ujung tidak rata sedangkan pengklonan DNA yang tidak memerlukan spesifikasi tertentu menggunakan ujung rata [6].

Dalam proses transformasi, *E. coli* TOP-10F' yang digunakan sebagai sel inang pada proses subkloning diketahui memiliki sifat sensitif terhadap kanamisin, berdasarkan hasil yang diperoleh (Gambar 2) sel inang yang ditransformasi dengan plasmid rekombinan pET-30a-*fim-C S. typhimurium* dapat hidup pada media yang mengandung kanamisin. Kontrol negatif yaitu sel kompeten *E. coli* TOP-10F' yang tidak ditransformasi dengan plasmid rekombinan tidak dapat tumbuh pada media yang mengandung kanamisin. Hal ini menunjukkan bahwa transformasi pET-30a-*fim-C S. typhimurium* pada sel inang *E. coli* TOP-10F' telah berhasil dilakukan.

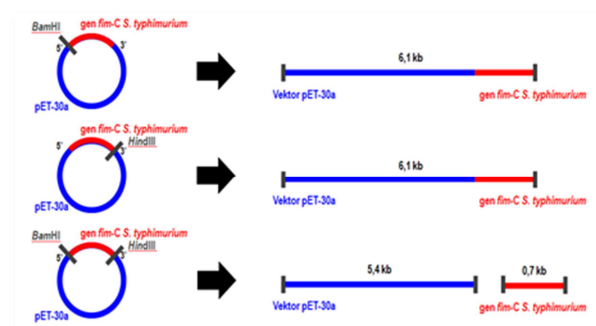
Tahap subkloning pET-30a-*fim-C S. typhimurium* pada sel inang *E. coli* TOP-10F' menghasilkan 7 koloni putih pada perbandingan ligasi 1:1, 7 koloni pada perbandingan 1:3 dan 11 koloni pada perbandingan 1:5. Dari hasil transformasi tersebut koloni tumbuh sama banyak pada perbandingan 1:1 dan 1:3, dan koloni tumbuh terbanyak pada perbandingan ligasi 1:5. Pada tahap selanjutnya koloni yang tumbuh pada perbandingan ligasi 1:1 dipilih untuk dikarakterisasi dan selanjutnya digunakan untuk transformasi ke bakteri yang memiliki sistem ekspresi seperti *E. coli* ArctricExpress (DE3).

Karakterisasi plasmid rekombinan pET-30a-*fim-C S. typhimurium* yang mengandung gen *fim-C S. typhimurium* 0,7 kb

1. Size Screening

Koloni yang dihasilkan dari transformasi diskriming untuk mengetahui apakah koloni tersebut mengandung plasmid rekombinan pET-30a-*fim-C* 0,7 kb *S. typhimurium*. Size

screening merupakan metode untuk memastikan adanya sisipan gen (*insert*) di dalam plasmid dengan membandingkan ukuran koloni yang tumbuh dengan plasmid koloni kontrol positif (sel inang dengan transforman plasmid pET-30a). Hasil *size screening* koloni rekombinan pET-30a-*fim-C S. typhimurium* (Gambar 3) menunjukkan terdapat satu koloni putih yaitu koloni 3, yang mengandung sisipan gen *fim-C S. typhimurium* berukuran 0,7 kb. Hal ini dapat dilihat dari pita ketiga pada pola pita plasmid rekombinan (diberi tanda kotak merah) yang memiliki ukuran yang lebih tinggi dari pita kontrol positif (lajur P). Satu-satunya koloni tersebut selanjutnya diberi nama plasmid rekombinan pET-30a-*fim-C* 0,7 kb *S. typhimurium*-(3) artinya rekombinan yang diisolasi dari koloni nomor 3.

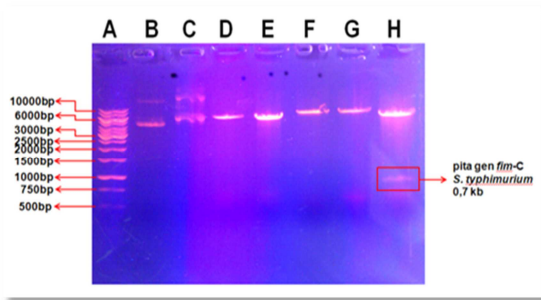


Gambar 6 Gambaran Hasil Analisis Enzim Restriksi Plasmid Rekombinan pET-30a-*fim-C S. typhimurium*.

Analisis teoritis menunjukkan plasmid rekombinan pET-30a-*fim-C S. typhimurium* dapat dipotong dengan enzim restriksi *Bam*HI dan *Hind*III.

2. PCR Koloni

Hasil amplifikasi (Gambar 4) menghasilkan pita berukuran 0,7 kb menunjukkan bahwa koloni 3 mengandung gen *fim-C* berukuran 0,7 kb, sesuai ukuran gen *fim-C* yang diamplifikasi dari genom *S. typhimurium* [5]. Adanya pita berukuran 0,7 kb pada koloni hasil subkloning yang dilakukan menunjukkan bahwa dalam koloni tersebut mengandung plasmid rekombinan pET-30a-*fim-C S. typhimurium*.



Gambar 7 Hasil Analisis Enzim Restriksi Plasmid Rekombinan pET-30a-*fim-C S. typhimurium* dengan Enzim *Bam*HI, *Hind*III, dan *Bam*HI-*Hind*III (*double digest*).

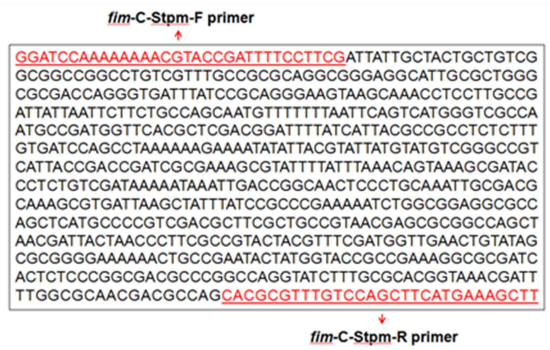
- Lajur A : 1kb DNA ladder (marker).
- Lajur B : pET-30a *uncut*.
- Lajur C : pET-30a-*fim-C S. typhimurium uncut*.
- Lajur D : pET-30a-*Hind*III.
- Lajur E : pET-30a-*Bam*HI-*Hind*III (*double digest*).
- Lajur F : pET-30a-*fim-C S. typhimurium-Bam*HI.
- Lajur G : pET-30a-*fim-C S. typhimurium-Hind*III.
- Lajur H : pET-30a-*fim-C S. typhimurium-Bam*HI-*Hind*III (*double digest*).

Dari hasil elektroforesis hasil isolasi plasmid rekombinan pET-30a-*fim-C S. typhimurium* (Gambar 5) dapat diketahui bahwa intensitas pita plasmid pET-30a-*fim-C S. typhimurium* ditunjukkan pada lajur I, J dan K. Pita yang timbul berada diantara pita 6000 bp dan 10000 bp. Hal ini sesuai dengan perhitungan jumlah ukuran vektor pET-30a dan gen *fim-C S. typhimurium* yaitu 6118 bp atau 6,1 kb (5,4 kb vektor pET-30a + 0,7 kb gen *fim-C S. typhimurium*). Pita plasmid rekombinan pET-30a-*fim-C S. typhimurium* 6,1 kb tersebut memiliki konsentrasi masing-masing secara berurutan dari lajur I, J dan K yaitu 12,5 ng/μL, 15 ng/μL dan 40 ng/μL.

3. Analisis Enzim Restriksi

Analisis restriksi plasmid rekombinan menggunakan enzim restriksi *Bam*HI dan *Hind*III telah berhasil dilakukan. Berdasarkan analisis teoritis terhadap urutan gen *fim-C* dan vektor pET-30a, enzim *Bam*HI akan memotong plasmid rekombinan pET-30a-*fim-C S. typhimurium* pada satu sisi dengan sisi

pengenal G↓GATCC. Enzim *Hind*III memotong plasmid rekombinan pET-30a-*fim-C S. typhimurium* pada satu sisi dengan sisi pengenal A↓AGCTT [7]. Pada analisis restriksi ini dilakukan 3 pemotongan yaitu dengan enzim *Bam*HI saja, enzim *Hind* III saja, dan dengan kedua enzim tersebut (*double digest*). Pemotongan enzim ini dilakukan sesuai dengan petunjuk kit Promega. Gambaran hasil analisis enzim restriksi disajikan pada Gambar 6. Hasil pemotongan enzim *Bam*HI adalah satu pita dengan ukuran 6,1 kb (5,4 kb vektor pET-30a + 0,7 kb sisipan gen *fim-C S. typhimurium*). Hasil pemotongan enzim *Hind*III juga satu pita dengan ukuran 6,1 kb (5,4 kb vektor pET-30a + 0,7 kb sisipan gen *fim-C S. typhimurium*). Hasil pemotongan dengan kedua enzim *Bam*HI dan *Hind*III (*double digest*) menghasilkan dua pita dengan ukuran 5,4 kb yaitu vektor pET-30a dan 0,7 kb yaitu gen *fim-C S. typhimurium*.



Gambar 8 Hasil Sekuensing Koloni 3 Plasmid Rekombinan pET-30a-*fim-C S. typhimurium*. Sequencing dari daerah primer *forward* sampai daerah primer *reverse*.

Analisis restriksi terhadap plasmid rekombinan (Gambar 7) yang dihasilkan dengan enzim *Bam*HI dan *Hind*III menunjukkan adanya kesesuaian ukuran dan jumlah pita yang dihasilkan antara analisis yang dilakukan terhadap fragmen 0,7 kb *S. typhimurium* hasil amplifikasi dengan templat kromosom *S. typhimurium*, sehingga disimpulkan bahwa sisipan yang terdapat pada plasmid rekombinan pET-30a adalah gen *fim-C S. typhimurium*.

Salmonella enterica subsp. enterica serovar Typhimurium str. LT2, complete genome
 Sequence ID: [gb|AE006468.1](#) Length: 4857432 Number of Matches: 1

Range 1: 25115 to 25798 [GenBank](#) [Graphics](#) [Next Match](#) [Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
1264 bits(684)	0.0	684/684(100%)	0/684(0%)	Plus/Plus

Features: [fimbrial_chaparonc](#)

```

Query 7      aaaaaaaaaCGTACCGATTTTCCTTCGATTATTGCTACTGCTGTGGCGGGCCGGCCTGTCG 66
            |||
Sbjct 25115  AAAAAAAAACTACCGATTTTCCTTCGATTATTGCTACTGCTGTGGCGGGCCGGCCTGTCG 25174

Query 67     TTTGCCGCGCAGGCGGGAGGCATTGCGCTGGGCGCGACCAGGGTGATTATCCGCAGGGA 126
            |||
Sbjct 25175  TTTGCCGCGCAGGCGGGAGGCATTGCGCTGGGCGCGACCAGGGTGATTATCCGCAGGGA 25234

Query 127    AGTAAGCAAACCTCCTTGCAGATTATTAATTCCTTCCAGCAATGtttttttAATTGAG 186
            |||
Sbjct 25235  AGTAAGCAAACCTCCTTGCAGATTATTAATTCCTTCCAGCAATGTTTTTTAATTGAG 25294

Query 187    TCATGGGTCGCAATGCCGATGGTTCACGCTCGACGGATTTTATCATTACGCCGCTCTC 246
            |||
Sbjct 25295  TCATGGGTCGCAATGCCGATGGTTCACGCTCGACGGATTTTATCATTACGCCGCTCTC 25354

Query 247    TTTGTGATCCAGCCTAAAAAGAAAAATATATTACGTATTATGTATGTCGGGCCGTCATTA 306
            |||
Sbjct 25355  TTTGTGATCCAGCCTAAAAAGAAAAATATATTACGTATTATGTATGTCGGGCCGTCATTA 25414

Query 307    CCGACCGATCGGAAAGCGTATTTTATTTAAACAGTAAAGCGATACCCCTCTGCGATAAA 366
            |||
Sbjct 25415  CCGACCGATCGGAAAGCGTATTTTATTTAAACAGTAAAGCGATACCCCTCTGCGATAAA 25474

Query 367    AATAAATTGACCGCAACTCCCTGCAAATTGGCAGCAAAGCGTGATTAAGCTATTTATC 426
            |||
Sbjct 25475  AATAAATTGACCGCAACTCCCTGCAAATTGGCAGCAAAGCGTGATTAAGCTATTTATC 25534

Query 427    CGCCGAAAAATCTGGCGGAGGCGCCAGCTCATGCCCGTCGACGCTTCGGTGGCCGTAAC 486
            |||
Sbjct 25535  CGCCGAAAAATCTGGCGGAGGCGCCAGCTCATGCCCGTCGACGCTTCGGTGGCCGTAAC 25594

Query 487    GAGCGGGCCAGCTAACGATTACTAACCCTTCGCGTACTACGTTTCGATGGTTGAAGTG 546
            |||
Sbjct 25595  GAGCGGGCCAGCTAACGATTACTAACCCTTCGCGTACTACGTTTCGATGGTTGAAGTG 25654

Query 547    TATAGCGGGGGAAAAAACTGCCGAATACTATGGTACCGCCGAAAGCGCGGATCACTCTC 606
            |||
Sbjct 25655  TATAGCGGGGGAAAAAACTGCCGAATACTATGGTACCGCCGAAAGCGCGGATCACTCTC 25714

Query 607    CCGGCGACGCCGGCCAGGTATCTTTGCGCACGGTAAACGATTTTGGCGCAACGACGCCA 666
            |||
Sbjct 25715  CCGGCGACGCCGGCCAGGTATCTTTGCGCACGGTAAACGATTTTGGCGCAACGACGCCA 25774

Query 667    GCACGCGTTTGTCCAGCTTCATGA 690
            |||
Sbjct 25775  GCACGCGTTTGTCCAGCTTCATGA 25798
    
```

Gambar 9. Hasil Analisis Homologi Nukleotida dengan BLAST. Query menunjukkan sekuen gen fim-C hasil kloning sedangkan subject menunjukkan sekuen gen fim-C *S.typhimurium* str. LT2.

4. Sekuensing

Sekuensing adalah proses atau teknik penentuan urutan basa nukleotida pada suatu molekul DNA. Hasil sekuensing yang diperoleh berupa kromatogram. Hasil kromatogram tersebut dianalisis menggunakan program seqmen (*DNASTAR*) menjadi bentuk FASTA (Gambar 8). Tanda yang digaris bawahi dan diberi warna merah pada hasil sekuensing adalah daerah primer yang sesuai, setelah dicocokkan dengan urutan primer yang digunakan pada saat amplifikasi gen *fim-C S.typhimurium*. Hasil sekuensing menunjukkan bahwa telah berhasil didapatkan pET-30a-*fim-C S.typhimurium* yang ditandai dengan adanya daerah primer pada hasil sekuen. Analisis homologi dilakukan dengan program BLAST menggunakan *Standard Nucleotide BLAST*

(www.ncbi.nlm.nih.gov) (Gambar 9). Dalam analisis homologi, hasil sekuensing diambil dari daerah primer *forward* sampai daerah primer *reverse*. Analisis homologi nukleotida hasil sekuensing dengan program BLAST pada GeneBank (AE006468.1) menunjukkan bahwa hasil sekuensing dengan ukuran 696 bp memiliki homologi sebesar 100% dengan urutan nukleotida gen *fim-C S.typhimurium* str. LT2 dengan ukuran 678 bp dari urutan 25115 sampai dengan 25798.

Hasil sekuensing dalam bentuk FASTA tersebut juga ditranslasi menjadi urutan asam aminonya dengan menggunakan program editseq (*DNASTAR*) (Gambar 10). Analisis homologi asam amino juga dilakukan dengan program BLAST pada *Standard Protein BLAST* (www.ncbi.nlm.nih.gov) (Gambar 11). Hasil

analisis homologi asam amino dengan BLAST pada GeneBank (NP_459027.1) menunjukkan bahwa urutan hasil sekuensing asam amino *Fim-C S. typhimurium* sebanyak 232 asam amino homolog 100% dengan 228 asam amino *Fim- S. typhimurium* str. LT2 dari urutan 2 sampai dengan 228.

```
GSKKNVPIFLRLLLLLSAAGLSFAAQAGGIALGATRVIIYP
QGSKQTSLPIINSSASNVFLIQSWVANADGSRSTDFIITP
PLFVIQPKKENILRIMYVGPLPTDRESVFYLNKAIPSV
DKNKLTGNSLQIATQSVIKLFIKPKNLAEAPAHAPSTLRC
RNERGQLTITNPSPIYYVSMVELYSAGKKLNTMVPPKG
AITLPATPGQVSLRTVNDGATTARVCPAS.KL
```

Gambar 10 Hasil Translasi Koloni 3 Plasmid Rekombinan pET-30a-*fim-C S. typhimurium*.

Hasil translasi tersebut berupa huruf-huruf alphabet yang melambangkan asam amino penyusun protein *Fim-C S. typhimurium*.

Transformasi plasmid rekombinan ke sel inang E. coli ArcticExpress (DE3)

Dari hasil transformasi yang dilakukan (Gambar 12), diperoleh 300 koloni rekombinan pET-30a-*fim-C S. typhimurium* yang telah berhasil ditransformasi pada sel inang *E. coli ArcticExpress (DE3)*. Adanya koloni sel inang yang tumbuh pada kontrol positif menunjukkan bahwa sel transforman mempunyai efisiensi yang tinggi dalam menerima DNA asing. Dari hasil ini dapat diketahui bahwa sel transforman yang bersifat resisten terhadap kanamisin yang mengandung plasmid rekombinan yang diharapkan. Berdasarkan hasil yang diperoleh dapat disimpulkan bahwa transformasi plasmid rekombinan pET-30a-*fim-C-S. typhimurium* dalam sel inang *E. coli ArcticExpress (DE3)* telah berhasil dilakukan.

Eksresi, isolasi dan karakterisasi protein rekombinan Fim-C S. typhimurium

Dalam manual instruksi *ArcticExpress Component Cells and ArcticExpress (DE3)*

Component Cells dikatakan bahwa sel inang *E. coli ArcticExpress (DE3)* memiliki enzim RNA *polymerase-T7*. Dan seperti yang telah diketahui pula bahwa vektor ekspresi pET-30a memiliki promotor bakteriofag-T7, sehingga bakteri *E. coli ArcticExpress (DE3)* sebagai sel inang bersifat kompatibel dengan vektor ekspresi pET-30a yaitu pada T7 promotor yang membawa vektor ekspresi.

Dalam proses overekspresi gen *fim-C S. typhimurium* menjadi protein rekombinan *Fim-C S. typhimurium*, sel inang *E. coli ArcticExpress (DE3)* yang mengandung plasmid rekombinan pET-30a-*fim-C S. typhimurium* diinduksi oleh IPTG (*Isopropyl-1-thio-β-D-galactopyranoside*). IPTG tersebut menghalangi penempelan represor pada daerah operator yang dimiliki oleh sel inang *E. coli ArcticExpress (DE3)*. Keadaan seperti ini memungkinkan enzim RNA *polymerase* dari sel inang *E. coli ArcticExpress (DE3)* menjadi aktif untuk mentranskripsi dan mentranslasi gen RNA *polymerase-T7* yang dimilikinya menjadi protein RNA *polymerase-T7*.

Protein RNA *polymerase-T7* yang dihasilkan berinteraksi dengan promotor bakteriofag-T7 yang terdapat pada plasmid rekombinan pET-30a-*fim-C S. typhimurium*. Interaksi ini merangsang ekspresi gen *fim-C* menjadi protein fusi *fim-C*. Menurut Chamberlin, RNA *polymerase* yang berasal dari virus T7 mampu mentranskripsi DNA dengan kecepatan 200 nukleotida per detik yang menyebabkan transkripsi gen target meningkat lebih dari 10x dibandingkan dengan kecepatan transkripsi normal pada *E. coli*. Proses ini terjadi pula pada ekspresi gen *fim-C* yang terdapat pada plasmid rekombinan pET-30a-*fim-C S. typhimurium* menjadi protein fusi *Fim-C*. Hasil proses ekspresi yang tinggi ini yang dapat teramati pada karakterisasi menggunakan elektroforesis SDS-PAGE yang ditunjukkan dengan meningkatnya intensitas pita protein [8].

fimbrial chaperone [Salmonella enterica subsp. enterica serovar Typhimurium str. LT2]
 Sequence ID: [ref|NP_459027.1](#) Length: 228 Number of Matches: 1
[See 119 more title\(s\)](#)

Range 1: 2 to 228 GenPept Graphics Next Match Previous Match

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
457 bits(1177)	1e-161	Compositional matrix adjust.	227/227(100%)	227/227(100%)	0/227(0%)
Query 3	KKNVFIFLRLLLLSAAGLSFAAQGGIALGATRVLYPQGSQTSLEPIINSSANVFLIQ				62
Sbjct 2	KKNVFIFLRLLLLSAAGLSFAAQGGIALGATRVLYPQGSQTSLEPIINSSANVFLIQ				61
Query 63	SWVANADGSRSTDFIITPPLFVIQPKKENILRIMYVGPSPLEPTDRESVFLNSKAIKPSVDK				122
Sbjct 62	SWVANADGSRSTDFIITPPLFVIQPKKENILRIMYVGPSPLEPTDRESVFLNSKAIKPSVDK				121
Query 123	NKLTGNSLQIATQSVIKLFRFKMLAEAPAHAPSTLRCRNERGQLTITNPSFYVSMVEL				182
Sbjct 122	NKLTGNSLQIATQSVIKLFRFKMLAEAPAHAPSTLRCRNERGQLTITNPSFYVSMVEL				181
Query 183	YSAGKLENTMVPKGAITLPATFGQVSLRTVNDFGATTPARVCPAS				229
Sbjct 182	YSAGKLENTMVPKGAITLPATFGQVSLRTVNDFGATTPARVCPAS				228

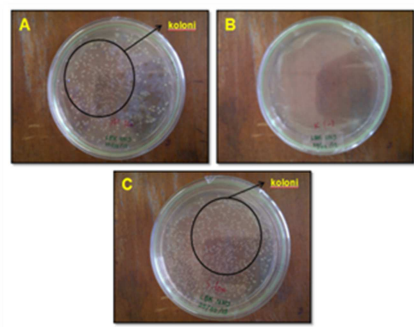
Gambar 11 Hasil Analisis Homologi Asam Amino dengan BLAST.

Query menunjukkan sekuen asam amino *fim-C* hasil kloning sedangkan *subject* menunjukkan sekuen asam amino *fim-C* *S.typhimurium* str. LT2.

Protein yang dihasilkan dari overekspresi kemudian diisolasi dengan menggunakan kit pET-system menunjukkan dari 100 mL kultur sel dihasilkan 4 mL protein ekstrak yang terlarut dalam sitoplasma dan 4 mL protein ekstrak yang membentuk agregat. Ekstrak protein hasil overekspresi pET-30a-*fim-C* *S. typhimurium* kemudian dielektroforesis dengan sistem SDS-PAGE menunjukkan adanya salah satu pita protein dengan intensitas yang lebih tinggi dibandingkan dengan pita yang lain pada ukuran antara 25 kDa dan 35 kDa. Pita protein yang memiliki intensitas yang lebih tinggi didapat pada protein ekstrak yang diisolasi dari pellet yang membentuk agregat (*inclusion bodies*).

Berdasarkan data elektroforegram SDS-PAGE (Gambar 13) menunjukkan bahwa hanya protein ekstrak sel inang yang mengandung rekombinan pET-30a *fim-C* *S. typhimurium* dan diinduksi dengan IPTG saja yang menghasilkan pita protein 31 kDa dengan intensitas tinggi (lajur F-H). Sementara protein ekstrak dari sel inang *E. coli* ArcticExpress (DE3) yang mengandung vektor pET-30a (lajur B-D) dan protein ekstrak dari sel inang *E. coli* ArcticExpress (DE3) yang mengandung rekombinan tetapi tidak diinduksi (lajur E)

tidak menghasilkan pita protein 31 kDa dengan intensitas tinggi. Berdasarkan perhitungan secara teoritis menggunakan program DNASTAR massa molekul protein fusi *Fim-C* *S. typhimurium* yang mengandung 10 asam amino histidin pada ujung 5' dan 12 asam amino yang mengandung urutan asam amino yang dikenali oleh faktor Xa adalah berkisar 31 kDa.

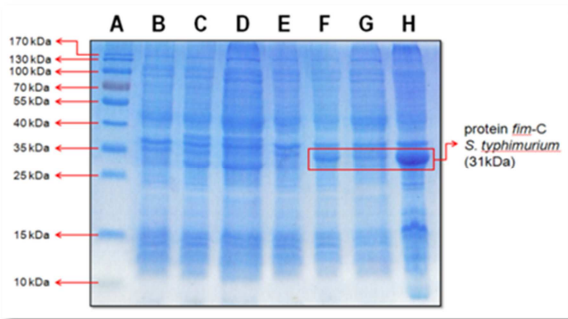


Gambar 12 Hasil Transformasi Sel Inang *E. coli* ArcticExpress (DE3) dengan Plasmid Rekombinan pET-30a-*fim-C*-*S. typhimurium*.

- A : Kontrol positif yaitu sel inang yang ditransformasi dengan plasmid vektor pET-30a (350 koloni).
- B : Kontrol negatif (tidak tumbuh koloni).
- C : Sel inang yang ditransformasikan dengan plasmid rekombinan mengandung sisipan gen *fim-C* *S. typhimurium* (300 koloni).

Pada penelitian ini protein *Fim-C* yang tidak larut dalam sitoplasma atau membentuk agregat yang biasa disebut dengan *inclusion bodies* (Gambar 13 lajur H) merupakan protein yang terekspresi lebih dibandingkan dengan protein *Fim-C* yang larut dalam sitoplasma. Terbentuknya protein *inclusion bodies* telah diketahui karena adanya interaksi antar molekul pada daerah-daerah hidrofobik protein selama proses *fold*ing dan hal tersebut sering dijumpai pada proses ekspresi protein yang menggunakan *E. coli* sebagai sel inang. Selain itu *inclusion bodies* juga dapat terbentuk karena jumlah protein *Fim-C* yang dihasilkan dari proses overekspresi sangat besar, akibatnya kelarutan protein *Fim-C* menjadi lebih kecil dan terbentuklah agregat.

Pembentukan *inclusion bodies* juga dipengaruhi oleh jenis protein, jenis sel inang, tingkat ekspresi, kondisi pertumbuhan sel serta kondisi induksi.



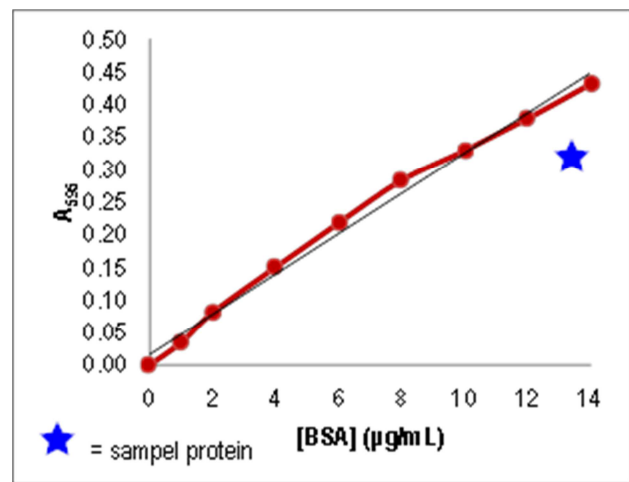
Gambar 13 Hasil Overekspresi Plasmid Rekombinan pET-30a-*fim-C S. typhimurium*.

- Lajur A : 3 µL protein marker (Biorad).
- Lajur B : 10 µL protein sel inang *E. coli* ArcticExpress (DE3) yang mengandung vektor pET-30a sebelum diinduksi.
- Lajur C : 7 µL protein sel inang *E. coli* ArcticExpress (DE3) yang mengandung vektor pET-30a setelah diinduksi.
- Lajur D : 7 µL protein sel inang *E. coli* ArcticExpress (DE3) yang mengandung vektor pET-30a yang terlarut dalam sitoplasma.
- Lajur E : 10 µL protein sel inang *E. coli* ArcticExpress (DE3) yang mengandung plasmid rekombinan pET-30a-*fim-C S. typhimurium* sebelum diinduksi.
- Lajur F : 5 µL protein sel inang *E. coli* ArcticExpress (DE3) yang mengandung plasmid rekombinan pET-30a-*fim-C S. typhimurium* sesudah diinduksi.
- Lajur G : 5 µL protein sel inang *E. coli* ArcticExpress (DE3) yang mengandung plasmid rekombinan pET-30a-*fim-C S. typhimurium* yang terlarut dalam sitoplasma.
- Lajur H : 2,5 µL protein sel inang *E. coli* ArcticExpress (DE3) yang mengandung plasmid rekombinan pET-30a-*fim-C S. typhimurium* yang membentuk agregat (*inclusion bodies*). Penampakan hasil dilakukan menggunakan SDS-PAGE 12% dengan pewarna *commasie blue*.

Berdasarkan hukum Lambert-Beer yang menyatakan bahwa besarnya serapan (A) proporsional dengan besarnya konsentrasi zat uji (c), untuk mengetahui tetapan konsentrasi

protein maka digunakan larutan standar yang diketahui konsentrasinya. Larutan standar yang digunakan adalah larutan Bovin Serum Albumin (BSA). Hal ini karena BSA merupakan protein yang umum digunakan sebagai standar dalam penetapan kadar protein, selain itu BSA memiliki tingkat kemurnian yang tinggi dan harganya relatif murah.

Hasil pengukuran absorbansi BSA disajikan dalam Tabel 1, dimana pengukuran dilakukan *triplo* agar akurasi data yang diperoleh lebih tinggi. Dari pengukuran absorbansi terhadap sampel protein *Fim-C S. typhimurium* diperoleh rata-rata absorbansi pada 0,383 dan masih berada pada jangkauan absorbansi protein BSA. Dari hasil pengukuran absorbansi BSA tersebut kemudian dibuat kurva standar (Gambar 14) untuk memperoleh persamaan garis sehingga dapat diketahui konsentrasi protein. Hasil pengukuran menunjukkan 4 mL protein ekstrak yang membentuk agregat mengandung 929 µg protein atau 0,929 mg protein.



Gambar 14 Kurva Standar Protein Menggunakan Metode *Bradford* dari Fermentas.

Kurva standar protein menghasilkan persamaan $y = 0,030x + 0,016$ dengan $R^2 = 0,991$.

4. Kesimpulan

Hasil penelitian menunjukkan bahwa telah berhasil diperoleh plasmid rekombinan pET-30a-*fim-C S. typhimurium* hasil konstruksi dan

subkloning sisipan gen *fim-C S. typhimurium* dari vektor kloning pGEM-T-*easy* ke vektor ekspresi pET-30a. Karakteristik plasmid rekombinan pET-30a-*fim-C S. typhimurium* yaitu mengandung gen *fim-C S. typhimurium* dengan ukuran 696 bp (0,7 kb) dan memiliki urutan nukleotida yang homolog 100% dengan gen *fim-C S. typhimurium* str. LT2 678 bp dari urutan 25115 sampai 25798 (GeneBank: AE006468.1 pada www.ncbi.nlm.nih.gov). Hasil penelitian juga menunjukkan telah berhasil diperoleh protein rekombinan *Fim-C S. typhimurium* hasil ekspresi gen *fim-C S. typhimurium* yang membentuk agregat (*inclusion bodies*) dengan ukuran 31 kDa. Protein rekombinan *Fim-C S. typhimurium*

memiliki 232 asam amino yang homolog 100% dengan 228 asam amino dari protein *Fim-C S. typhimurium* str. LT2 dari urutan 2 sampai 228 (GeneBank: NP_459027.1 pada www.ncbi.nlm.nih.gov). Protein fusi *Fim-C S. typhimurium* yang diperoleh dari 4 mL protein ekstrak adalah 0,929 mg.

Penghargaan

Peneliti mengucapkan terima kasih terhadap Penelitian Strategis Nasional 2012 yang telah mendukung pendanaan sehingga penelitian ini berhasil dilakukan. Terima kasih juga kepada Jurusan Kimia FMIPA UNJ serta seluruh rekan-rekan Biokimia ITB atas kerjasama dan bantuannya.

Daftar Pustaka

- [1] Zhang, S., Robert, A. K., Renato, L. S., Helene, A. P., Manuela, R., Josely, F., Jairo, N., Renee, M. T., Garry, A., dan Andreas, J. B. 2003. Patogenesis Molekuler *Salmonella enteric* serotype Diare typhimurium-induced. *Infection and Immunity*. 71 (1): 1-12.
- [2] Raidal, S. R., Bonne, N. J., dan Stewart M. 2004. Development of Recombinant Proteins as a Candidate Vaccine for Psittacine Beak and Feather Disease. *Final Report for the Australian Government Department of the Environment and Heritage*. Perth: Murdoch University.
- [3] Muktiningsih, Dewi, F. K., Sukmawati, D. S., Sandra, R. N., dan Wulansari, F. 2009. Pengembangan Metode Deteksi Bakteri Penyebab Penyakit Typhus pada Manusia dengan Polymerase Chain Reaction. *Laporan Hasil Penelitian*. Jakarta: Lembaga Penelitian UNJ.
- [4] Ledebor, N.A. dan Jones, B.D. 2005. Exopolysaccharide Sugars Contribute to Biofilm Formation by *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* on HEp-2 Cells and Chicken Intestinal Epithelium. *J Bacteriol*, 187 (9): 3214-3226.
- [5] Alviyanto, Giri., Dewi, F. K., Kartika, I. R., Puspasari F., Muktiningsih, dan Natalia D. 2012. Cloning of *Salmonella typhimurium fim-C* Gene With pGEM-T-*easy* Vector As Model For Development of Vaccine Recombinant Typhus Disease in Human. *The Fourth Gruber-Soedigdo Lecture 2012*, P17: 50.
- [6] Anam, Khairul. 2009. DNA Rekombinasi. *Laporan Praktikum Genetika Molekular*. Bioteknologi Sekolah Pasca Sarjana IPB, Bogor.
- [7] Devor, E. J. 2005. IDTutorial: Restriction Endonucleases*. *Integrated DNA Technologies*. 2-3.
- [8] Muktiningsih. 2005. Produk Gen *carA Salmonella typhi* Berukuran 42 kDa yang Dideteksi dengan Antibodi Anti-Protein Fusi. *Disertasi*. Institut Teknologi Bandung.