

ISOLATION OF *Salmonella typhoid* 16s rRNA GENE FRAGMENT BASED ON POLYMERASE CHAIN REACTION (PCR)

Salman Farisi*, Wawan A. Setiawan, Suratman

Jurusan Biologi FMIPA Universitas Lampung
Jl. Prof. Dr. Soemantri Brodjonegoro No. 1 Bandar Lampung 35145
e-mail: alfarisi.mdr@gmail.com

ABSTRACT

This study is a further step for the development of a diagnosis of typhoid fever. Through previous research, it was found that typhoid *Salmonella* bacteria isolates from a sample of patients indicated typhoid fever in Bandar Lampung. Local typhoid *Salmonella* DNA has been isolated. The maximum quality and quantity of DNA were obtained by adding 3% Polyvinylpyrrolidone (PVP). The next step of DNA analysis becomes easier because the optimal method of isolating typhoid *Salmonella* DNA has been known. However, for the accuracy of the development of PCR-based molecular markers, species-specific information from the *Salmonella typhoid* bacterial isolate is required to be used as a template. Information on the specific species of typhoid *Salmonella* can be determined by performing PCR using 16s rRNA fragments. The highly conserved nature of rRNA makes it possible to synthesize universal primers for PCR processes capable of attaching to conserved sequences of the rRNA genes of the three phylogenetic domains: Archaea, Bacteria and Eukarya. PCR is a technique used to amplify nucleic acid sequences using repeated polymerization of DNA sequences. The simplicity and high success rate of amplification of the DNA sequences obtained have made this technique more widely used. In carrying out PCR, the DNA extract, DNA polymerase enzyme, and primer are reacted in a suitable buffer solution. The PCR reaction is carried out with the help of a thermocycle device. Through this research, a single band of local typhoid *Salmonella* genomic DNA amplification was obtained through PCR using 16s rRNA primers. It is known that the amplicon size is in the range of 1400 bp.

Keywords: Amplicon, DNA genom, Fragmen 16s rRNA, Local tyroid *Salmonella*, PCR

PENDAHULUAN

Demam tifoid atau demam enterika disebabkan oleh bakteri golongan *Salmonella* Typhoidal serotip *Salmonella typhi*, *Salmonella paratyphi A*, *Salmonella paratyphi B*, dan *Salmonella paratyphi C*. *Salmonella* merupakan bakteri berbentuk batang, gram negatif, tidak membentuk spora, tidak berkapsul, dan bersifat motil (Sanderson, 2015). Menurut World Health Organization (WHO) 2004, sebanyak 21 juta kasus demam tifoid mencapai angka kematian 216.000 jiwa tiap tahunnya (Zhou dan Pollard, 2012). Di Indonesia, rata-rata terdapat 900.000 kasus per tahun dengan kematian sebanyak 20.000 per tahun (WHO, 2003). Rahmajati (2011) mengemukakan bahwa angka kematian

demam tifoid yang masih tinggi salah satunya disebabkan oleh diagnosis yang kurang cepat dan akurat.

Sampai saat ini, metode standar diagnosis demam tifoid yang direkomendasikan oleh Kementerian Kesehatan Republik Indonesia adalah melalui uji WIDAL. Uji WIDAL merupakan suatu metode serologi baku dan digunakan sejak tahun 1896. Prinsip uji WIDAL adalah memeriksa reaksi antara antibodi aglutinin dalam serum penderita yang telah mengalami pengenceran berbeda-beda terhadap antigen somatik (O) dan flagela (H) yang ditambahkan dalam jumlah yang sama sehingga terjadi aglutinasi. Menurut Eriksson E. dan Aspan A. (2007), uji WIDAL ini masih menimbulkan bias yaitu

adanya hasil negatif palsu (false negatif) sehingga bisa menimbulkan kesalahan dalam penanganannya yang bisa berakibat kematian pasien. Pemeriksaan serologi menggunakan Widal test memiliki nilai akurasi 38.8% sensitivitas 16.7%, dan spesivitas 73.7% (Rahmajati, 2011). Selain tes Widal, untuk menegakkan diagnosis demam tifoid dapat menggunakan rapid test. Rapid test memiliki nilai sensitivitas dan spesifisitas yang lebih tinggi dibandingkan dengan Widal test dengan nilai sensitivitas sebesar 72,7% dan spesifitas 65,9% (Loman, 2012). Persentasi tersebut menunjukkan perlu adanya uji penunjang yang lebih cepat, spesifik, dan sensitif. Keakuratan dalam mendiagnosa penyakit demam tifoid ini menjadi hal yang mutlak.

Di sisi lain, perkembangan diagnosa molekuler berbasis Polymerase Chain Reaction (PCR) bagi patogen Salmonella penyebab demam tifoid telah banyak dilakukan (Eriksson E. dan Aspan A. 2007; Khan et. al. 2012; Zhou dan Pollard. 2012). Kualitas maupun kuantitas DNA templat merupakan salah satu faktor penentu keberhasilan PCR. Melalui penelitian sebelumnya telah didapatkan isolat bakteri Salmonella tifoid dari sampel pasien terindikasi demam tifoid di Bandar Lampung. DNA Salmonella tifoid telah berhasil diisolasi. Kualitas dan kuantitas DNA maksimum didapatkan melalui penambahan Polyvinylpyrrolidone (PVP) sebanyak 3% (Setiawan dan Ekowati, 2015). Ini berarti langkah analisis DNA selanjutnya menjadi lebih mudah karena metode optimal isolasi DNA Salmonella tifoid telah diketahui. Namun, untuk keakuratan pengembangan marka molekuler berbasis PCR, diperlukan informasi spesies spesifik dari isolat bakteri Salmonella tifoid yang akan digunakan sebagai templat. Informasi spesies spesifik Salmonella tifoid tersebut dapat diketahui dengan melakukan PCR menggunakan fragmen 16s rDNA.

METODE

Penelitian ini dilakukan di laboratorium Zoologi Fakultas Matematika dan Ilmu

Pengetahuan Alam Universitas Lampung pada Juli - Agustus 2016.

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini meliputi thermocycler, laminar air flow cabinet, autoclave, freezer, kulkas, tabung reaksi dan sumbat, cawan petri, neraca analitik, inkubator, alat elektroforesis DNA, alat spin, mikropipet 1000 μ L, mikropipet 200 μ L, mikropipet 20 μ L, erlemeyer, botol akuades, bunsen, dan gelas ukur.

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah akuades steril, ddH₂O steril, ekstrak DNA Salmonella tifoid, agarose, ethidium bromide TAE 1x, loading dye, marker PCR 100 pb, mikrotube 1,5 ml, mikrotip 1000 μ L, mikrotip 100 μ L, mikrotip 20 μ L, plastic wrap, alkohol 70%, etanol 95%, dan spirtus.

Primer yang digunakan adalah primer universal untuk domain bakteri berupa forward primer 63f (5'-CAG GCC TAA CAC ATG CAA GTC-3') dan reverse primer 1387r (5'-GGG CGG WGT GTA CAA GGC-3') (Marchesi et al. 1998). Semua komponen reaksi dicampur ke dalam mikrotube dan dimasukkan ke dalam mesin PCR. Tahapan PCR terdiri dari pre- denaturasi 94°C, 2 menit; tahap denaturasi 92°C, 30 detik; tahap annealing 55°C, 30 detik, tahap elongasi 72°C selama 1 menit. Proses PCR terdiri dari 30 siklus. Selanjutnya post PCR pada suhu 75°C selama 20 menit dan tahap stop PCR pada suhu 4°C. Hasil PCR disimpan pada suhu -20°C atau langsung dielektroforesis.

Hasil PCR, kontrol positif berupa marker 100bp, dan kontrol negatif ddH₂O dielektroforesis. Gel elektroforesis disiapkan dengan 0,8 % agarose dalam 1x buffer TAE (0,24 gr agarose dalam 30 ml 1xTAE) (50x tris-asetat EDTA (TAE):1 l dH₂O, 242 gr Trisbasa, 37,2 gr Na₂EDTA, 57, 1 ml asam asetat glasial), dipanaskan dan setelah larut didinginkan sampai

50°C kemudian dituang pada cetakan gel. Wadah yang sudah berisi gel diberi buffer 1x TAE secukupnya kemudian memasukkan sampel hasil digesti pada sumur-sumur gel. Sampel hasil PCR, kontrol positif, dan kontrol negatif masing-masing sebanyak 10 μ l dicampur dengan 1 μ l loading dye lalu dimasukkan ke dalam sumur gel. Elektroforesis dilakukan pada tegangan 100

Volt selama 28 menit. Gel lalu dipindahkan ke dalam larutan ethidium bromide (EtBr) 0,5 mg/l selama 5 menit dan selanjutnya visualisasi pita DNA diamati di atas

UV setelah sebelumnya dicuci dengan ddH₂O. Setelah didapatkan pita DNA, amplicon PCR

yang didapat bisa dijadikan templat untuk sekuensing dengan metode Sanger. Hasil PCR yang baik ditunjukkan dengan didapatnya pita DNA yang bersih tanpa adanya smear.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Amplifikasi gen 16S-rRNA dengan PCR
Primer yang digunakan adalah primer universal untuk domain bakteri berupa forward primer 63f (5'-CAG GCC TAA CAC ATG CAA GTC-3') dan reverse primer 1387r (5'-GGG CGG WGT GTA CAA GGC-3') (Marchesi et al. 1998).

Untuk masing-masing tube PCR, dilakukan mix:

Nama Bahan	Volume (µl)
ddH ₂ O	7
Template DNA	2
Master Mix PCR	10
Primer Forward	0,5
Primer Reverse	0,5

Setting alat PCR:

Tahapan PCR	Suhu (°C)	Waktu (menit)
Pradenaturasi (pra PCR)	95	5
Denaturasi	94	0,5
Annealing	50	1
Extensi	72	2
Extensi akhir	72	5
Pendinginan	20	10

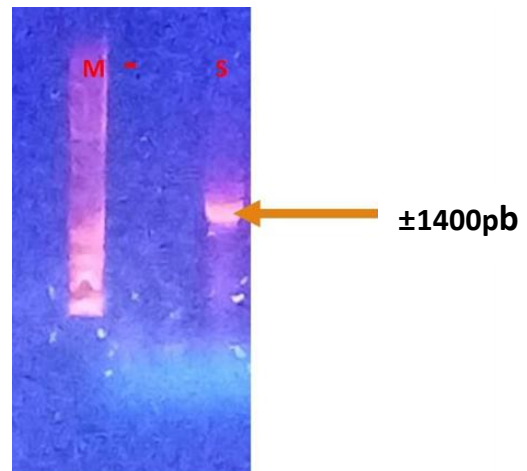
Elektroforesis Hasil PCR

Hasil PCR, kontrol positif berupa marker 1 kb dari fermentas, dan kontrol negatif ddH₂O dielektroforesis. Gel elektroforesis disiapkan dengan 1 % agarose dalam 1x buffer TAE (0,4 gr agarose dalam 40 ml 1xTAE) (50x tris-asetat EDTA (TAE):1 l ddH₂O, 242 gr Trisbasa, 37,2 gr Na₂EDTA, 57,1 ml asam asetat glasial), dipanaskan dan setelah larut

ditambahkan gelred sebanyak 0,4 µl. Larutan didinginkan sampai 50°C kemudian dituang pada cetakan gel. Wadah yang sudah berisi gel diberi buffer 1x TAE secukupnya kemudian dimasukkan sampel hasil digesti pada sumur-sumur gel. Sampel hasil PCR, kontrol positif, dan kontrol negatif masing-masing sebanyak 10 µl dicampur dengan 1 µl loading dye lalu dimasukkan ke dalam sumur gel. Elektroforesis dilakukan pada tegangan 100 Volt selama 28 menit. Visualisasi pita DNA diamati di atas UV. Setelah didapatkan pita DNA, amplicon PCR yang didapat bisa dijadikan templat untuk sekuensing dengan metode Sanger.

Hasil elektroforesis ditunjukkan pada gambar

berikut:



Gambar 1. Visualisasi hasil PCR dengan Elektroforesis. Ket: M = Marker 1kb; - = kontrol negatif; S = sampel

Melalui visualisasi hasil PCR dengan elektroforesis tersebut diketahui bahwa dihasilkan pita tunggal hasil PCR dengan primer 16s-rRNA. Menurut Marchesi et al. (1998) mendesain dan mengevaluasi primer 63f dan 1387r untuk amplifikasi gen 16S-rRNA dari domain bakteri. Pasangan primer ini mampu mengamplifikasi gen 16S-rRNA dengan ukuran sekitar 1400 pasang basa. Ini menandakan bahwa hasil amplifikasi tersebut dapat dilanjutkan untuk dilakukan sekuensing.

KESIMPULAN

Melalui penelitian ini disimpulkan bahwa DNA Salmonella tifoid sampel teramplifikasi pada PCR menggunakan primer 16s-rRNA. Hasil ini selanjutnya bisa digunakan untuk

DAFTAR PUSTAKA

Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. 2002. *Molecular Biology of the Cell*. Fourth Edition. Garland Science: New York.

Bauman RW. 2012. *Microbiology With Diseases By Body System 3rd Edition*. Benjamin Cummings. San Francisco.

Case RJ, Boucher Y, Dahllöf I, Holmström C, Doolittle WF, Kjelleberg S. 2007. "Use of 16S rRNA and rpoB genes as molecular markers for microbial ecology studies". *Appl. Environ. Microbiol.* 73 (1), 278–88.

Drancourt M, C Bollet, A Carlioz, R Martelin, JP Gayral, D Raoult. 2000. 16s Ribosomal DNA Sequence Analysis of a Large Collection of Environmental and Clinical Unidentifiable Bacterial Isolates. *J. Clin. Microbiol.* 38:3623-3630.

Eriksson E, Aspan A. 2007. Comparison of culture, ELISA and PCR techniques for salmonella detection in faecal samples for cattle, pig and poultry. *BMC Veterinary Research.* 3:21 doi:10.1186/1746-6148-3-21.

Kayser FH, Bienz KA, Eckert J, Zinkernegele RM. 2004. *Medical Microbiology*. Thieme. New York.

Khan S, Harish BN, Menezes GA, Acharya NS, dan Parija SC. 2012. Early

dilakukan sekuensing dengan metode Sanger.

diagnosis of typhoid fever by nested PCR for flagellin gene of Salmonella enterica serotype Typhi. *Indian J Med Res.* 136:850-854. Sanderson, K. E., Shu-Lin L., Le Tang, Randal N. J. 2015. *Salmonella typhi and Salmonella paratyphi A*. *Molecular Medical Microbiology*. Chapter 71

Loman GA. 2010. Uji Diagnostik Pemeriksaan Imunoserologi IgM Anti Salmonella Metode IMBI dan Rapid Test Terhadap Baku Emas Kultur Salmonella typhi pada Penderita Tersangka Demam Tifoid. Universitas Kristen Maranatha.

Madigan MT, Martinko JM, Stahl DA, Clark DP. 2012. *Brock Biology of Microorganisms*. Ed ke-13. San Francisco: Pearson Education. ISBN:9780321649638.

Marchesi JR, Sato T, Weightman A.J., Martin TA, Fry JC, Hiom SJ, Wade WG. 1998. Design and evaluation of useful bacterium-specific PCR primers that amplify genes coding for bacterial 16S rRNA. *Appl Environ. Microbiol.* 64:795-9.

Menkes. 2006. Keputusan Menteri Kesehatan Republik Indonesia Nomor 364/MENKES/SK/V/2006 Tentang Pedoman Pengendalian Demam Tifoid. Kementerian Kesehatan. Jakarta

