



## ISOLASI, AMPLIFIKASI DAN SEKUENSING FRAGMENT 1,9 KILOBASA GEN *HEAT SHOCK PROTEIN 70* *SALMONELLA ENTERICA* SEROVAR TYPHI

Muktiningsih\*, Fera Kurniadewi, Imanuelle Orchidea R.P

Department of Chemistry, Faculty of Mathematics and Science, Universitas Negeri Jakarta  
Jl. Pemuda No. 10, Rawamangun 13220, Jakarta, Indonesia

\* Keperluan korespondensi: [muktiningsih@unj.ac.id](mailto:muktiningsih@unj.ac.id)

Received 6 January 2016

Received in revised from 9 March 2016

Accepted 5 April 2016

### ABSTRAK

*Salmonella enterica* serovar Typhi merupakan penyebab demam tifoid atau penyakit tifus pada manusia. Mekanisme molekuler patogenesitas *Salmonella* merupakan sistem yang kompleks dan diatur oleh sejumlah gen dan faktor-faktor virulen. Salah satu gen tersebut adalah *dnaK* yang mengatur sintesis *Heat Shock Protein 70* (HSP70). Penelitian ini bertujuan untuk memperoleh gen HSP70 yang berukuran 1,9 kilobasa dari bakteri *Salmonella enterica* serovar Typhi. Gen tersebut dapat digunakan untuk pengembangan vaksin tifus maupun diteliti lebih lanjut untuk mengungkap fungsi lainnya. Gen HSP70 berhasil diamplifikasi dari genom *S. Typhi* dengan reaksi polimerisasi DNA (PCR) menggunakan pasangan primer spesifik HSP70. Hasil elektroforesis menunjukkan bahwa produk amplifikasi tersebut berukuran 1900 pasang basa. Produk PCR dimurnikan sebelum urutan nukleotidanya ditentukan melalui sekuensing. Analisis hasil sekuensing menunjukkan produk PCR tersebut memiliki homologi sebesar 99% dengan *dnaK* (gen HSP70) *S. enterica* serovar Typhi strain CT18 yang terdapat pada *gene database* NCBI.

**Kata Kunci:** *Salmonella enterica* serovar Typhi, PCR, *dnaK*, HSP 70, sekuensing

### ABSTRACT

*Salmonella enterica* serovar Typhi is the main agent causing typhoid fever on human. Molecular pathogenicity mechanism of *Salmonella* is a highly complex system and regulated by a number of genes and virulen factors. One of these genes is *dnaK* which control the synthesis of Heat Shock Protein 70 (HSP70). The aim of this study is to obtain 1,9 kilobases length of HSP70 gene from *Salmonella enterica* serovar Typhi. The gene could serve as an alternative antigen for typhoid vaccine development either used in further study to reveal other roles and mechanism of actions. HSP70 gene had been successfully amplified from *S. Typhi*'s genome using Polymerase Chain Reaction with specific primer pair of HSP70. Electrophoresis result has been shown that amplicon product was 1900 base pairs in length. PCR product had been purified before sequencing process done. Sequencing result analysis shown that the PCR product has approximately 99% homologous with *dnaK S. enterica* serovar Typhi strain CT18 in NCBI gene database.

**Keywords :** *Salmonella enterica* serovar Typhi, PCR, *dnaK*, HSP70, sequencing.

### PENDAHULUAN

Demam tifoid, atau yang lebih populer dengan sebutan penyakit tifus

adalah suatu infeksi akut pada usus yang disebabkan oleh bakteri *Salmonella enterica* serovar Typhi. Demam tifoid merupakan problem kesehatan masyarakat yang umum

terjadi di negara-negara berkembang di benua Afrika dan Asia, termasuk Indonesia. Hal ini disebabkan oleh kurangnya kesadaran masyarakat di negara-negara berkembang terhadap pentingnya kebersihan dalam pengolahan makanan dan minuman yang dikonsumsi. Selain itu, buruknya sanitasi dan kurang memadainya sarana air bersih di negara berkembang turut menjadi salah satu penyebab penyebaran demam tifoid [1].

Secara global insidensi demam tifoid mencapai 27 juta kasus setiap tahun [1]. Penyakit ini memiliki tingkat morbiditas dan mortalitas yang signifikan setiap tahunnya, yaitu sebanyak 90 juta orang secara global [12]. Pada tahun 2002 insidensi demam tifoid di Indonesia sebanyak 148-200 kasus per 100.000 penduduk [11]. Sementara pada tahun 2007, jumlah kasus demam tifoid bertambah menjadi 358-810 kasus per 100.000 penduduk [7]. Fakta tersebut menunjukkan bahwa insidensi demam tifoid di Indonesia cenderung meningkat setiap tahun.

Selain itu, berkembangnya resistensi bakteri dari genus *Salmonella* terhadap beberapa jenis antibiotika seperti fluorokuinolon, *trimethoprim-sulfamethoxazole* (TMP-SMZ), ampisilin, maupun kelas antibiotika spektrum luas seperti sefalosporin misalnya *ceftriaxone*, atau *cefixime* [5]. Hal ini menyebabkan peneliti di seluruh dunia berusaha menemukan cara baru untuk menanggulangi demam tifoid; antara lain dengan cara mempelajari mekanisme patogenesis, jenis-jenis antigen dan faktor virulen bakteri *S. Typhi* [2,5,6,9,11,16,17,18,20], memetakan genom *S. Typhi* [3], menemukan alat deteksi

demam tifoid [7], dan membuat vaksin demam tifoid [15].

Infeksi oleh bakteri *Salmonella enterica* serovar Typhi terjadi melalui jalur oral. Yaitu melalui makanan/ minuman yang terkontaminasi bakteri *Salmonella enterica* serovar Typhi. Bakteri yang menempel di makanan/ minuman masuk ke mulut, melalui saluran pencernaan, menembus dinding usus halus, masuk ke sistem limpa, beredar lewat aliran darah, dapat menyerang liver, kantung empedu, limpa, ginjal dan sumsum tulang [16].

Bakteri *S. Typhi* mampu bertahan dalam sel-sel fagosit, tinggal di dalamnya, memperbanyak diri dan menyebar dalam aliran darah. Hal tersebut dimungkinkan oleh mekanisme pertahanan bakteri yang melibatkan sekelompok *Heat Shock Protein* (HSP), yaitu gabungan DnaK dan DnaJ. Terdapat beragam jenis HSP, salah satunya adalah HSP70. HSP70 merupakan golongan protein stres yang berperan sebagai pemandu (*chaperone*) molekul dalam sel. Protein ini berfungsi menstabilkan dan melindungi polipeptida-polipeptida yang terlipat sebagian atau terdenaturasi dalam sel sebagai akibat dari stres yang disebabkan proses fagositosis oleh makrofag [20]. DnaK (HSP70) sendiri juga dilaporkan mampu mengaktifasi ekspresi gen-gen flagela melalui modulator kompleks protein natif yang terdiri dari FlhD dan FlhC. Sintesis HSP70 suatu organisme diatur oleh dnaK, yaitu gen HSP70 [18]. Gen HSP70 merupakan salah satu regulator dalam tahap awal patogenesis dan mengatur pertahanan bakteri *Salmonella enterica* serovar Typhi terhadap sel-sel fagosit [20]. Oleh karena itu, HSP

merupakan kelompok protein yang dapat digunakan sebagai kandidat vaksin, karena dapat berfungsi sebagai antigen yang dapat menimbulkan respon imun, sekaligus sebagai ajuvan yang dapat meningkatkan kekebalan sel terhadap antigen peptida spesifik [13,15].

Secara umum, penelitian ini bertujuan untuk memperoleh gen HSP70 (dnaK) berukuran 1,9 kilobasa dari bakteri *Salmonella enterica* serovar Typhi. Suatu gen dapat diperoleh dengan memperbanyaknya dari hasil isolasi DNA genom melalui reaksi yang disebut *Polymerase Chain Reaction* [14].

Penelitian ini merupakan studi awal terhadap gen *Heat Shock Protein* (HSP). Penelitian ini penting dilakukan untuk memperoleh gen HSP70 *Salmonella enterica* serovar Typhi untuk diteliti lebih lanjut dalam rangka pengembangan vaksin tifus berbasis *Heat Shock Protein*, ataupun untuk mengungkap fungsi lainnya dalam patogenesis demam tifoid.

## METODE PENELITIAN

### 1. Pembiakkan Bakteri S.Typhi

Kultur bakteri S.Typhi ditumbuhkan dalam medium *Salmonella-Shigella Agar* pada 37°C selama 18-24 jam. Kemudian koloni murni S.Typhi hasil biakan diambil dengan jarum ose steril dan diinokulasi ke dalam medium cair *Luria Bertani Broth* steril. Biakan bakteri dalam medium cair diinkubasi selama 18-24 jam dengan bantuan *orbital shaker*.

### 2. Isolasi Genom Bakteri S.Typhi

Suspensi bakteri S.Typhi sebanyak 1,5 ml disentrifugasi pada 13000g selama 2 menit. Pellet sel bakteri dilisis dengan *Nuclei Lysis Solution* (Promega) dan diinkubasi pada 80°C selama 5 menit. Selanjutnya RNase (Promega) ditambahkan ke dalam campuran lisat bakteri, lalu diinkubasi selama 30 menit pada 37°C. Setelah inkubasi selesai, ke dalam campuran tersebut ditambahkan 200 µl *Protein Precipitation Solution* (Promega). Campuran divorteks dan diinkubasi dalam es selama 5 menit sebelum disentrifugasi kembali pada 13000g.

Supernatan hasil sentrifugasi di-ambil. lalu ditambahkan isopropanol. Pellet DNA dipisahkan dengan sentrifugasi pada 13000g selama 2 menit. Pellet DNA dicuci dengan etanol 70%. Setelah itu disentrifugasi kembali pada 13000g. Sentrifugat dilarutkan dalam *DNA Rehydration Solution* (Promega) sebanyak 100 µl.

Isolat genom S.Typhi dikarakterisasi dengan elektroforesis agarosa 2% yang diberi tambahan pewarna etidium bromida 0,05%. Elektroforesis dilakukan selama satu jam pada tegangan 80 V.

### 3. Amplifikasi Gen HSP70 S.Typhi

Amplifikasi gen HSP70 S. Typhi telah dilakukan melalui reaksi berantai polimerase (PCR), menggunakan pasangan primer spesifik HSP70 *Forward* (5'-ggatccggtaaaattattggtatcgac-3') dan HSP70 *Reverse* (5'-aagctttatcttttacttctcaaac-3') (Tabel 1) dalam campuran reaksi PCR yang mengandung master mix (dNTP, Enzym DNA Polymerase, buffer enzim), pasangan

primer HSP70, DNA *Genom S. Typhi*, dan *Nuclease Free Water*. PCR dilakukan terhadap larutan sampel, kontrol positif (K+) dan kontrol negatif (K-) (Tabel 2). Hasil amplifikasi gen HSP70 dikarakterisasi dengan elektroforesis gel agarosa 1,5% dengan tambahan pewarna etidium bromida 0,05%. Elektroforesis dilakukan selama satu jam pada tegangan 80 V.

Tabel 1. Data Pasangan Primer HSP70

DATA	HSP70 Forward	HSP70 Reverse
OD	7,4	8,2
MW	8338,4	10881,2
T <sup>o</sup> m	65,3°C	65,3°C
Nmol	23,9	22
GC%	40,7	22,2

Tabel 2. Formulasi Campuran PCR

K (+)	Tabung Sampel	K (-)
<i>Master mix</i> 12,5 µL	<i>Master mix</i> 12,5 µL	-
Primer F – HSP70 1 µL	Primer F - HSP70 1 µL	-
Primer R –HSP70 1 µL	Primer R - HSP70 1 µL	-
<i>Stock Genom S. Typhi</i> , 1 µL	<i>DNA Template</i> 1 µL	-
<i>Nuclease Free Water</i> 9,5 µL	<i>Nuclease Free Water</i> 9,5 µL	<i>Nuclease Free Water</i> 25 µL

Hasil amplifikasi gen HSP70 dimurnikan dengan teknik *spin column* sebelum dikirim ke Macrogen, Inc. Korea Selatan untuk disekuensing. Konsentrasi minimum DNA yang diperlukan untuk sekuensing sebanyak 200ng/µl dengan volum minimal 30µl.

#### 4. Sekuensing Gen HSP70 S.Typhi

Amplikon gen HSP70 hasil purifikasi dikirim ke Macrogen, Inc. Korea Selatan untuk disekuensing dengan cara disaring dengan penyaring buchner.

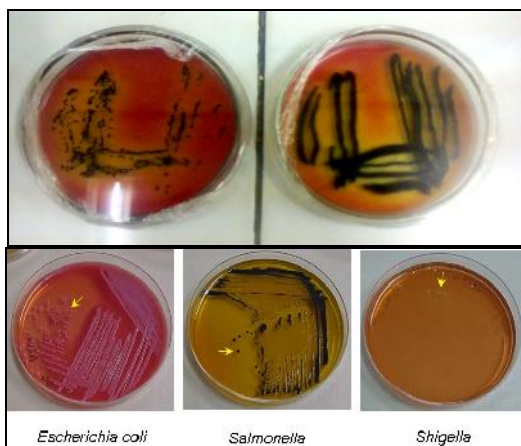
### HASIL DAN PEMBAHASAN

#### 1. Pembiakkan Bakteri *S. Typhi*

Bakteri *S. Typhi* telah berhasil dibiakkan dalam medium padat *Salmonella-Shigella Agar* (SSA) (Gambar 1). Koloni bakteri yang berwarna hitam menandakan bahwa bakteri tersebut positif berasal dari genus *Salmonella*, dan bebas dari kontaminasi bakteri lain. Medium SSA adalah medium spesifik yang biasa digunakan untuk mendeteksi kontaminasi bakteri dari genus *Salmonella* pada makanan [4]. Komponen utama *Salmonella-Shigella Agar* yang berperan dalam selektivitasnya adalah laktosa, pepton, garam empedu, besi (III) sitrat, dan indikator *neutral red*. Garam empedu selektif terhadap bakteri gram negatif, dengan kata lain, bakteri gram positif tak dapat tumbuh dalam medium ini. Komponen lainnya berfungsi untuk diferensiasi antara genus bakteri gram-negatif yang satu dengan yang lainnya.

Prinsip diferensiasi jenis-jenis bakteri tersebut didasarkan perbedaan kemampuan metabolisme bakteri. Bakteri dari genus *Salmonella* tidak memfermentasi laktosa, namun menghasilkan H<sub>2</sub>S dan enzim tiosulfat reduktase sehingga akan membentuk koloni berwarna hitam. Koloni bakteri dari genus *Shigella* tidak memfermentasi laktosa dan tidak

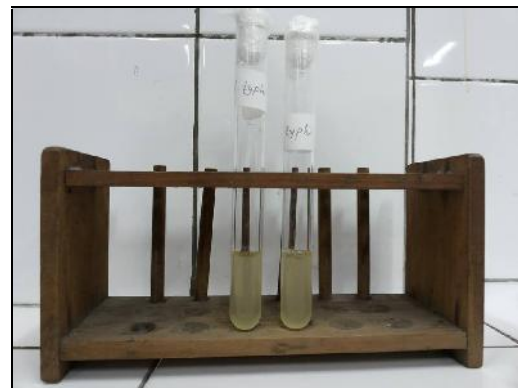
menghasilkan H<sub>2</sub>S maupun enzim tiosulfat reduktase sehingga akan tumbuh sebagai koloni berwarna putih, atau tidak berwarna. Bakteri koliform *Escherichia coli* juga dapat tumbuh pada medium SSA dengan koloni berwarna merah muda karena kemampuannya memfermentasi laktosa, namun tidak menghasilkan H<sub>2</sub>S sehingga tidak membentuk endapan hitam [4, 5].



Gambar 1. Biakan Bakteri *S. Typhi* pada SS Agar.

Warna medium SSA yang semula merah berubah menjadi kuning. Hal tersebut menunjukkan adanya perubahan pH pada medium. Bakteri dari genus *Salmonella* menggunakan pepton sebagai sumber energi karena tidak dapat memfermentasi laktosa. Hasil sampingan metabolisme tersebut adalah amonia, yang menaikkan pH medium SSA [10]. Reaksi kimia yang terjadi pada pembiakan bakteri *S. Typhi* adalah reduksi natrium tiosulfat di dalam SSA oleh enzim tiosulfat reduktase menjadi sulfid [4]. H<sub>2</sub>S yang dihasilkan sebagai metabolit bersama ion S<sup>2-</sup> dalam sulfid bereaksi dengan besi (III) sitrat membentuk endapan hitam besi (II) sulfida [19].

Bakteri *S. Typhi* perlu dibiakkan dalam medium selektif seperti SSA untuk memastikan kemurnian koloni *S. Typhi* yang akan diinokulasi dalam medium cair *Luria Bertani Broth* (Gambar 2). Medium non selektif harus disterilisasi dengan baik, namun kemungkinan kontaminasi mikroorganisme lain masih ada. Medium SSA tidak perlu disterilisasi, karena telah mengandung inhibitor mikroorganisme lain, selain bakteri *Salmonella*, *Shigella*, dan *Escherichia*.

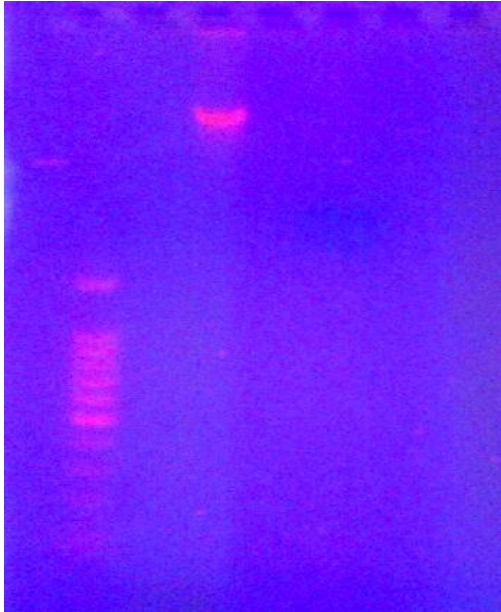


Gambar 2. Biakan *S. Typhi* dalam *Luria Bertani Broth*.

## 2. Isolasi Genom Bakteri *S. Typhi*

Isolasi genom bakteri *Salmonella enterica* serovar *Typhi* telah berhasil dilakukan menggunakan Wizard® *Genomic DNA Purification Kit* dari Promega. Prinsip isolasi DNA pada dasarnya terdiri dari empat tahap utama; (1) Lisis sel untuk mengeluarkan materi genetik, dapat berupa DNA dan RNA. (2) Mengeliminasi RNA, dan protein pengikat dengan penambahan enzim dan reagen pendenaturasi protein. (3) Pengendapan debris protein dengan sentrifugasi agar larutan DNA dapat dipisahkan dengan mudah. (4)

pengendapan DNA dengan isopropanol, sentrifugasi untuk memisahkan presipitat DNA dan dilanjutkan pencucian dengan etanol 70% untuk memperoleh hasil ekstraksi DNA dengan kemurnian yang baik.



Gambar 3. Hasil Elektroforesis DNA Genom *S. Typhi*

Hasil elektroforesis agarosa menunjukkan pita DNA genom *S. Typhi* berupa pita ganda, yang berarti DNA genom yang diisolasi berbentuk sirkular (Gambar 3). Selain itu, letak pita DNA yang jauh di atas pita marker DNA 1500 bp menandakan bahwa ukuran DNA yang diisolasi sangat besar. Semakin besar ukuran molekul suatu DNA, semakin lambat migrasinya sepanjang agarosa dalam proses elektroforesis. Hasil elektroforesis genom *S. Typhi* sesuai dengan referensi, yang menyatakan bahwa genom *S. Typhi* berbentuk sirkular dengan ukuran 4,8 megabasa [3].

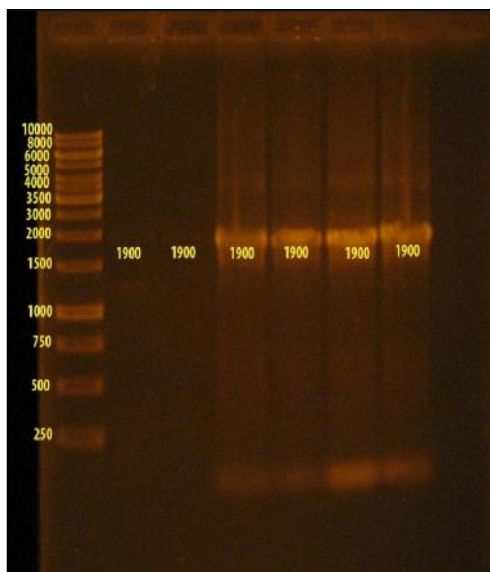
Kemurnian dan konsentrasi DNA hasil isolasi genom *S. Typhi* diukur dengan spektrofotometer nanodrop. Konsentrasi

DNA genom yang telah diisolasi sebesar 346,23ng/μl dalam tabung 1 dan 157,64 ng/μl dalam tabung 2. Pita ganda DNA menyerap spektrum UV pada panjang gelombang 260 nm. Sementara kontaminan protein dan fenol menyerap spektrum UV pada panjang gelombang 280 nm. Dengan demikian, kemurnian DNA dapat diukur dengan menghitung nilai absorbansi pada panjang gelombang 260 nm dan 280 nm.

### 3. Amplifikasi dan Purifikasi Gen HSP70 *S. Typhi*.

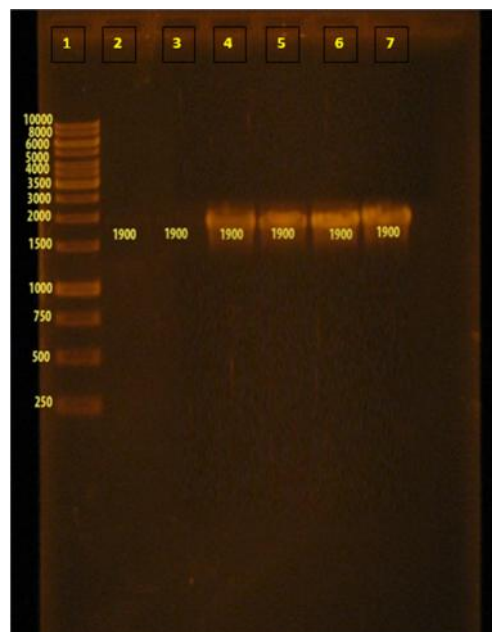
Gen HSP70 *S. Typhi* telah berhasil diamplifikasi dengan pasangan primer HSP70 *Forward* (5'-ggatccggtaaaat tattggatcgac-3') dan HSP70 *Reverse* (5'-aagctttatctttacttcttcaaactc-3'). Pasangan primer HSP70 tersebut dirancang untuk menghasilkan produk amplifikasi yang mengandung situs restriksi *Bam*HI (ggatcc) dan *Hind*III (aagctc) pada ujung 5' dan 3' secara berturut-turut. Kondisi optimum untuk amplifikasi gen HSP70 *S. Typhi* antara lain, pra-denaturasi selama 5 menit pada 95°C sebanyak satu siklus, dilanjutkan dengan denaturasi pada 95 °C selama 30 detik, tahap *annealing* primer pada 47,4°C, dan ekstensi pada 72°C selama 2 menit masing-masing tiga puluh siklus. Selanjutnya tahap ekstensi akhir untuk menyempurnakan amplifikasi DNA, 72°C selama 5 menit sebanyak satu siklus dan pendinginan pada 12°C selama 5 menit sebanyak satu siklus. Nilai %GC dalam primer F dan R berturut-turut sebesar 40,7 dan 22,2, menyebabkan rendahnya suhu *annealing* optimum.

Amplikon gen HSP70 *S. Typhi* telah dikarakterisasi dengan elektroforesis gel agarosa 1,5% pada tegangan 80 V selama satu jam. Hasil analisa *gel documentation system* setelah elektroforesis menunjukkan bahwa amplikon Gen HSP70 berukuran 1,9 kilobasa (Gambar 4).



Gambar 4. Hasil Elektroforesis Produk PCR. Lane : (1) K+ ;(2-5) Produk PCR gen HSP 70 ; (6) K-

Hasil amplifikasi DNA tersebut masih belum bebas dari pengotor, yaitu sisa-sisa primer maupun dNTP yang ditandai dengan pita-pita DNA di bawah marker DNA 250 bp. Pita-pita berukuran 1900 bp tersebut kemudian dipotong dengan pisau *cutter* yang telah disterilkan dalam *UV sterilizer*, lalu ditimbang. Potongan gel tersebut digunakan untuk proses purifikasi DNA menggunakan metode ekstraksi gel dengan *spin column*. Konsentrasi amplikon gen HSP70 *S. Typhi* hasil purifikasi yang memenuhi syarat sekuensing sebesar 200 ng/ $\mu$ l (Gambar 5).



Gambar 5. Hasil Elektroforesis Produk PCR Setelah Purifikasi. Diperoleh ukuran pita dan massa DNA sebagai berikut : (1) DNA Marker 1000bp (2) 14 ng (3) 9 ng (4) 138 ng (5) 113 ng (6) 200 ng (7) 187 ng.

#### 4. Sekuensing Gen HSP70 *S. Typhi*

Amplikon gen HSP70 *S. Typhi* telah melewati tahap sekuensing di Macrogen, Inc. Korea Selatan (Gambar 6). Hasil analisis BLAST menunjukkan bahwa urutan nukleotida hasil amplifikasi gen HSP70 tersebut 99% identik dengan urutan nukleotida gen HSP70 *Salmonella enterica* serovar Typhi dalam *GeneBank* NCBI.

#### KESIMPULAN

Penelitian ini telah berhasil; (1) mengisolasi genom dari kultur bakteri *Salmonella enterica* serovar Typhi (2) mengamplifikasi gen HSP70 *S. Typhi* berukuran 1,9 kilobasa (3) memperoleh urutan nukleotida hasil amplifikasi gen HSP70 *S. Typhi* dengan sekuensing primer

walking dengan homologi terhadap gen database NCBI sebesar 99%.

```
GGTAAAATTATTTGGTATCGACCTGGGTCTCCANCTCTT
GTGTAGCGATTATGGATGGAACGCAGGCACGCGTGCTG
GAGAACGCCGAGGGCGATCGCACTACGCCTTCTATCAT
TGCTTATACCCAGGATGGTGAACCTGGTTGGTCAGC
CGGCTAAACGTCAGGCAGTGAACAAACCCGCAAAACACC
CTGTTTGGGATTAACGCCTGATTGGCCGCCGCTTCCA
GGACGAAGAAGTTCAACGTGACGTTTCTATCATGCCGT
ACAAAATCATCGGCGCCGACAACGGCGACGCATGGCTT
GATGTGAAAGGTCAGAAAATGGCGCCGCCGAGATTTTC
TGCCGAAGTGCTGAAGAAAATGAAGAAAACGGCTGAAG
ATTATCTGGGCGAACCGGTAACCTGAAGCGGTTATCACC
GTACCGGCTTACTTTAACGATGCGCAGCGTCAGGCAAC
CAAAGATGCTGGTCTGATCGCGGGGCTGGAAGTTAAAC
GTATCATCAACGAACCGACTGCCGACGCGTGGCTTAC
GGTCTGGATAAAGAAGTCGGCAACCGTACTATCGCGGT
TTACGACCTCGGTGGTGGTACTTTCGATATCTCTATTA
TCGAAATCGACGAAGTTGATGGCGAATAAACCTTTGAA
GTTCTGGCAACCAACGGTGATAACCCACTGGGTTGGTG
AAGACTTCGATACCCGCTGATCAACTACCTCGTTGAC
GAGTTTAAGAAAGATCAGGGCATTGACCTGCGTAACGA
TCCGCTGGCCATGCAAGCGCTGAAAAGAACCCGCAAAA
AAGCCAAAATCGAAGTGTCTTTCGCGCAACAAAACCTA
CCTGGAACCTGCCGTACATTAACCGCAAATGCCACCTG
TTCCAAAACCCATTGAACATCCAAATGACCCGTGCGA
AACTGAAAAGCTGGTTGAAAGATCTGGTGAACCGTTCT
ATCGAGCCGCTGAAAGTCGCACTGCAGGACGCTGGCCT
GTCCGTGTCTGATATCAACGACGTGATCCTCGTCGGCG
GTCAGACCCGTATGCCAATGGTGCAGAAAAAGTGGCT
GAGTTCTTCGTTAAAGAGCCCGCTAAAGACGTTAACCC
GGACGAAGCTGTGGCTATCGGCGCAGCGGTACAGGGCG
GCGTATGACCGGTGATGTGAAAGACGTAAGTCTGCTG
GACGTTACCCCGCTGTCTCTGGGTATCGAAACGATGGG
TGGCGTGATGACTCCCGCTTATCACCAAAAACACCACCA
TCCCGACCAAGCACAGCCAGGTGTTATGTACTGTGGAA
GACAACTGTTTGGCGTAACCATCCATGTGCTGCAGGG
TGAGCGTAAACGTGCGTCTGATAACAAATCTCTGGGTC
AGTTCAACCTGGATGGCATCAACCCGCGCGCGCGGT
ATGCCGACAGTCGAAGTCACCTTCGATATCGATGCTGA
CGGTATCCTGCACGTCTCCGCGAAAAGATAAAAATAGCG
GTAAAGAGCAGAAGATCACTATCAAGGCGTCTTCTGGT
CTGAACGAGGAAGAAAATTCAGAAAATGGTTCCGCGATGC
AGAAGCGAACGCTGAATCCGACCGTAAGTTCGAAGAGC
TGGTTTACGACCCGTAACCCAGGGTGACCATCTGCTGCAC
AGCACCCGTAAGCAGGTTGAAGAAGCAGGCGATAAACT
GCCGCTGATGACAAAACCGCTATCGAGTCTGCGCTGA
GCGCGCTGAAAACCTGCCCTGAAAGGGGAAGATAAAGCC
GCTATCGAAGCGAAAATGCAAGGAGCTGGCGCAGGTTTC
CCAGAACTGATGAAAATCGCTCAGCAGCAACATGCCG
AGCAGCAGGCTGGCTCCGCCGACGCTTCTGCAACAAT
CGGAAAGATGACGACGTTGTGCGACGCTGAGTTGAAGA
AGTAAAAGATAAAAGCTT
```

Gambar 6. Hasil Sekuensing Gen HSP70 (dnaK) S. Typhi

**UCAPAN TERIMAKASIH**

Penulis menyampaikan terimakasih kepada Jurusan Kimia PMIPA, Universitas Negeri Jakarta yang telah memfasilitasi peralatan dalam penelitian ini.

**DAFTAR RUJUKAN**

[1] Crump, John. A and Eric D. Mintz. 2010. *Clinical Infectious Diseases* 2010, 50, 241-6.

[2] De Jong, HK, et.al. 2012.. *PLoS Pathog* 8(10): e1002933.

[3] Deng, W., Liou, S. R., Plunkett, G. III, Mayhew, G. F., Rose, D. J., Burland, V., Kodoyianni, V., Schwartz, D. C., and Blattner, F. R. 2003. *J. Bacteriol.* 2003, 185(7), 2330-2337.

[4] Downes, F. P. dan Ito K. 2001. *Compendium of Methods for The Microbiological Examination of Foods, 4<sup>th</sup> Ed.*, APHA, Washington, D.C.

[5] Fabrega, Anna dan Jordi Vila, 2013, *Clinical Microbiology Reviews*. Vol. 26 No. 2. p.308-341.

[6] Grimont PAD, Weill FX., 2007, *Antigenic formulae of the Salmonella serovars, 9th revision*, World Health Organization Collaborating Center for Reference and Research on Salmonella, Pasteur Institute, Paris, Perancis.

[7] Grimont PAD, Weill FX., 2007, *Antigenic formulae of the Salmonella serovars, 9th revision*, World Health Organization Collaborating Center for Reference and Research on Salmonella, Pasteur Institute, Paris, Perancis.

[8] Heymann, DL. Ed., 2008, *Control of Communicable Diseases Manual* (19<sup>th</sup> Edition). American Public Health Association, 978-0-87553-189-2, Washington, D.C.

[9] Kaufmann, S. H. E., 1990, *Immunol. Today*, 11, 129-136.

[10] Lehman, Donald., 2013, *Triple Sugar Iron Agar Protocols*. ASM.

[11] Leon, R. O., 2008, *Bulletin of The World Health Organization*. 86, 4, 241-320.

[12] Majowicz, S. E., 2010, *Clin. Infect Dis*, 50, 882-889.



- [13] McNulty, S., 2013, *Rev.Immunology*, 139, 407-415.
- [14] McPherson, M.J. and Møller, S., 2006, *PCR 2<sup>nd</sup> Edition*. Taylor & Francis Group, New York
- [15] Paliwal, P.K., 2011, *Vaccine*, 29, 6532-6539.
- [16] Takaya, A., Tomoyasu, T., Matsui, H., Yamamoto, T., 2004, *Infection and Immunity*, 72, 3,1364-1373.
- [17] Takaya, A, Kubota, Y, Isogai, E, Yamamoto, T., 2005, *Mol. Microbiol.*, 55, 839–852.
- [18] Takaya, A., Matsui M., Tomoyasu T., *Mol. Microbiol.*, 59, 1327–1340.
- [19] Vogel, A. I. dan G. Svehla, 1996. *Vogel's Qualitative Inorganic Analysis 7<sup>th</sup> ed*. Prentice Hall, Inc. New Jersey, USA.
- [20] Yamamoto, T., Sashinami, H., Takaya, A., Tomoyasu, T., Matsui, H., Kikuchi, Y., Hanawa T., Kamiya S. and Nakane, A., 2001, *Infect Immun*, 69, 3164–3174.