



# **Analisis Kekerabatan *Salmonella typhi* Asal Jateng dan Yogyakarta Berdasarkan Sekuens Gen Flagellin *fliC***

**Sri Darmawati<sup>\*</sup>, Muhammad Evy Prastiyanto**

Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Ilmu Keperawatan dan Kesehatan  
Universitas Muhammadiyah Semarang Jl. Kedungmundu Raya No. 18  
Semarang

E-mail: ciciekdarma@yahoo.com, Telp. 08122503552

## ***Intisari***

Tujuan penelitian untuk analisis kekerabatan *Salmonella typhi* asal Jawa Tengah dan Yogyakarta berdasarkan sekuens gen flagellin *fliC* dan mengetahui jenis serovarnya serta mengetahui keanekaragaman genetiknya. Sampel penelitian adalah 10 strain bakteri *Salmonella typhi* (7 strain dari Semarang, 1 strain dari Salatiga dan 2 strain dari Yogyakarta) yang diisolasi dari kultur darah pasien Widal positif. Analisis sekuens gen *fliC* dilakukan dengan isolasi DNA, PCR, kemudian sekuensing. Analisis kekerabatan dilakukan dengan merekonstruksi pohon filogeni berdasarkan *Algoritme Neighbour Joining* (NJ), dan analisis similaritas nukleotida digunakan program *Phydit*. Hasil PCR dan sekuensing menunjukkan ukuran gen *fliC* pada *Salmonella typhi* SLT.1 asal Salatiga adalah 1267bp sedangkan 9 strain yang lainnya berukuran 1452-1488bp. Analisis kekerabatan berdasarkan *Algoritme* NJ, topologi pohon filogeni terdiri dari 6 *clade*, berturut-turut *clade* 1 dan 2 beranggotakan masing-masing 3 strain, *clade* 3, 4, 5 dan 6 masing-masing beranggotakan 1 strain. Strain SLT.1 berkerabat dekat dengan BA 07.4 (nilai similaritas 98,83%) dan EM.3 (nilai similaritas 98,74%) isolat Semarang yang terletak pada *clade* 1.

**Kata kunci:** Analisis kekerabatan, *Salmonella typhi*, flagellin, gen *fliC*

## **Pendahuluan**

*Salmonella typhi* (*S. typhi*) adalah bakteri penyebab demam tifoid yang sampai saat ini masih menjadi masalah kesehatan di dunia (Hamid & Jain, 2008). Bakteri ini memiliki antigen O (somatik) yang tersusun dari lipopolisakarida (LPS), antigen flagel

(antigen H) tersusun dari protein flagellin, antigen Vi (kapsul) tersusun dari karbohidrat dan antigen *fimbriae* yang tersusun dari protein pillin (Brenner *et al.*, 2000). Antigen H terdiri dari 2 fase yaitu antigen H fase 1 (H1) yang dikode oleh gen *fliC* yang dapat dijumpai pada semua *Salmonella* dan antigen H fase 2 (H2) dikode oleh gen *fliB* yang hanya dijumpai pada subspecies tertentu dari *Salmonella* (McQuiston *et al.*, 2004).

Antigen H1 terdiri dari H1-d yang dijumpai pada *S. typhi* serovar H1-d yang tersebar luas di dunia dan H1-j pada *S. typhi* serovar H1-j yang hanya dijumpai di Indonesia (Grossman *et al.*, 1995). Antigen d dan j keduanya dikode oleh gen *fliC* yang berada pada kromosom, tetapi gen *fliC* yang mengkode j antigen mengalami delesi 251bp yang berakibat pada perubahan epitop antigen dari flagel. Ekspresi antigen j pada *Salmonella* berakibat pada gejala klinik demam tifoid (Baker *et al.*, 2008). Patogenitasnya sangat tergantung pada sejumlah faktor virulensi, seperti kemampuan untuk *adhesi* (melekat) pada sel *host*, flagella, enzim, toksin, faktor bioaktif. Faktor virulensi yang akan memfasilitasi bakteri untuk melekat pada mukosa usus halus, invasi, multiplikasi dan menyebar masuk ke jaringan limfoid sampai ke aliran darah dan beredar ke seluruh tubuh sampai pada hati, sumsum tulang, limfa, kandung empedu dan *Peyer's patch* (Alexan *et al.*, 2009; Jindal *et al.*, 2012; Darmawati *et al.*, 2013).

Flagellin adalah komponen utama flagella pada bakteri dan merupakan faktor virulensi yang dapat dikenali oleh sistem imun alamiah (Hayashi *et al.*, 2001), selain itu protein flagellin dapat digunakan untuk identifikasi serologi pada *S. typhi* (McQuiston *et al.*, 2004). Oleh karena itu penelitian ini bertujuan untuk menganalisis kekerabatan *Salmonella typhi* asal Jawa Tengah (Semarang dan Salatiga) dan Yogyakarta berdasarkan sekuens gen flagellin *fliC*, untuk mengetahui jenis serovarnya dan mengetahui keanekaragaman genetiknya, diharapkan hasil penelitian ini dapat mengetahui keanekaragaman genetik *S. typhi* yang berasal dari ketiga daerah tersebut dan dapat digunakan sebagai dasar untuk melacak epidemiologi demam tifoid.



## Metode Penelitian

### *Sampel Bakteri*

Sampel penelitian ini adalah bakteri *S. typhi* isolat Semarang sebanyak 7 strain (strain BA 07.3, BA 07.4, BA 07.5, KD 27.2, KD 30.3, SA 02.2, EM.3), satu strain isolat Salatiga (*S. typhi* SLT.1) dan 2 strain isolat Yogyakarta (*S. typhi* BET dan *S. typhi* SRJ). Sampel diperoleh dari hasil isolasi kultur darah Widal positif (Darmawati *et al.*, 2012a; Darmawati *et al.*, 2012b)

### *PCR dan Sekuensing gen fliC*

Isolasi DNA genom bakteri digunakan *DNeasy Blood dan Tissue Kits* (Qiagen, katalog nomor 69504) dengan langkah-langkah persiapan lisat sel, pengikatan DNA, pencucian DNA, elusi DNA dan penyimpanan DNA. Amplifikasi gen *fliC* digunakan primer LPW 1856 (5'-ATGGCACAAGTCATTAATACAAAC-3') dan LPW 1857 (5'-TTAACGCAGTAAAGAGAGGACGTT-3') (Lau *et al.*, 2005)

Reagen yang digunakan untuk amplifikasi gen *fliC* dengan metode *Polymerase Chain Reaction* (PCR) adalah Maxima Hot Start Green PCR Master Mix (2X) (Thermo Scientific, K1061) dan ukuran yang digunakan adalah 12,5 µl master Mix, primer LPW 1856 dan LPW 1857 masing-masing 1 µl, DNA cetakan 1 µl, dH<sub>2</sub>O steril 7,5 µl, volume setiap tabung adalah 25µl, digunakan alat *Applied Biosystems GeneAmp PCR System 2400*.

Amplifikasi gen *fliC* dilakukan sebanyak 30 siklus pada kondisi: suhu 95°C selama 30 detik untuk melakukan denaturasi DNA, 46°C selama 30 detik untuk melakukan proses penempelan primer pada DNA cetakan (primer LPW 1856 dan LPW 1857), untuk ekstensi pada suhu 72°C selama 2 menit dengan *final extention* pada suhu 72°C selama 10 menit untuk melakukan proses polimerisasi DNA. Hasil amplifikasi fragmen DNA dipisahkan dengan 1% *Agarose Gel Electrophoresis* berdasarkan kenampakan pita tunggal pada 1500bp. Visualisasi ampikon menggunakan *Major Science UV transluminator*. Sekuensing DNA dilakukan pada alat sekuenser *ABI Prism<sup>TM</sup> 310*.

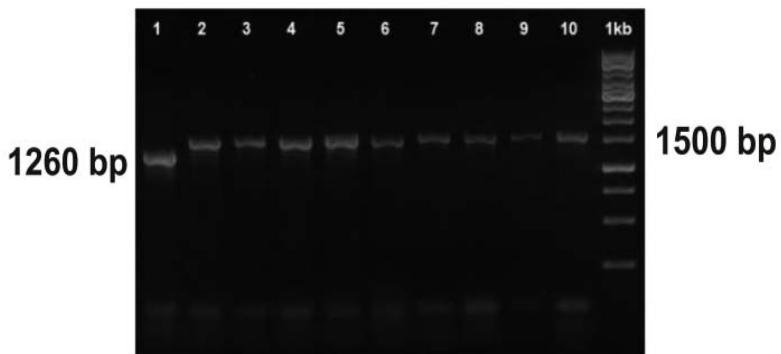
## ***Analisis Kekerbatan dan analisis similaritas S. typhi***

Analisis kekerabatan dilakukan dengan merekonstruksi pohon filogeni berdasarkan *Algoritme Neighbour Joining*, dan analisis similaritas nukleotida digunakan program *Phydit*.

### **Hasil dan Pembahasan**

#### ***Hasil PCR gen fliC***

Hasil PCR gen flagellin *fliC* menggunakan primer LPW 1856 dan LPW 1857, yang kemudian dielektroforesis menggunakan 1% agarose ditunjukkan pada Gambar 1. Hasilnya menunjukkan bahwa ukuran pita pada hasil PCR gen *fliC* pada strain *S. typhi* SLT.1 isolat Salatiga setara dengan 1260 bp, tampak berbeda dengan pita dari 9 strain *S. typhi* yang lainnya dengan ukuran setara dengan 1500bp. Kejadian ini senada dengan hasil penelitian Lau *et al.* (2005) dan Baker *et al.* (2008), bahwa gen flagellin *fliC* yang berukuran setara dengan 1260 bp menyandi gen *fliC* H1-J dari *S. typhi* serovar H1-j, bakteri ini kurang motil dan kurang invasif apa bila dibandingkan *S. typhi* serovar H1-d.



Gambar 1. Hasil PCR gen *fliC* 10 strain *S. typhi* (1) SLT-1, (2) BA 07.3, (3) BA 07.4, (4) BA 07.5, (5) KD 27.2, (6) KD 30.3, (7) SA 02.2, (8) EM.3, (9) BET, (10) SRJ, Marker



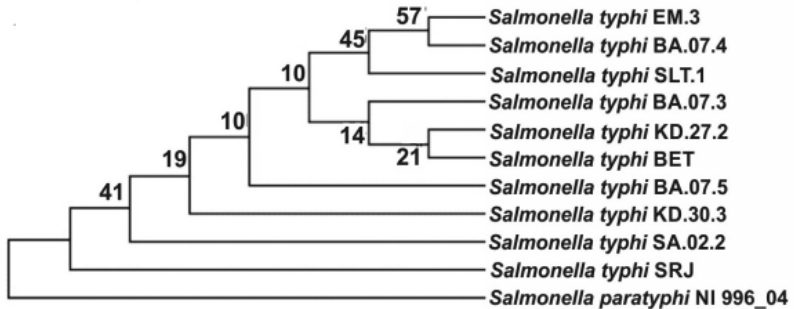
*Salmonella typhi* serovar H1-j hanya dijumpai di Indonesia, gen *fliC* terdapat pada kromosom yang menyandi flagellin tipe H-1j sama dengan gen *fliC* yang menyandi flagellin tipe H1-d tetapi mengalami delesi 260 bp, sehingga hanya berukuran kira-kira 1267 bp (Tabel 1). Sebanyak 10 strain *S. typhi* terdapat 1 strain H1-J (10%), 9 strain (90%) strain H1-d.

Tabel 1. Ukuran flagellin gen *fliC* dari 10 isolat *S. typhi* asal Jawa Tengah dan Yogyakarta berdasarkan hasil sekuensing

Strain	Asal	Ukuran gen <i>fliC</i>
<i>S. typhi</i> BA 07.3	Semarang	1454 bp
<i>S. typhi</i> BA 07.4	Semarang	1458 bp
<i>S. typhi</i> BA 07.5	Semarang	1454 bp
<i>S. typhi</i> EM 3	Semarang	1456 bp
<i>S. typhi</i> KD 27.2	Semarang	1456 bp
<i>S. typhi</i> KD 30.3	Semarang	1452 bp
<i>S. typhi</i> SA 02.2	Semarang	1464 bp
<i>S. typhi</i> SLT-1	Salatiga	1267 bp
<i>S. typhi</i> SRJ	Yogyakarta	1488 bp
<i>S. typhi</i> BET	Yogyakarta	1454 bp

### Analisis Keekerabatan *S. typhi*

Analisis kekerabatan 10 strain *S. typhi* isolat Jawa Tengah dan Yogyakarta yang dilakukan dengan merekonstruksi pohon filogeni berdasarkan *Algoritme Neighbour Joining*, dan analisis similaritas nukleotida dengan program *Phydit* hasilnya ditunjukkan pada Gambar 2 dan Tabel 2. Tipologi pohon filogeni menunjukkan adanya 6 *clade*, berturut-turut *clade* 1, 2, beranggotakan masing-masing 3 strain *S. typhi*, *clade* 3, 4, 5, 6 masing-masing beranggotakan 1 strain. Strain *S. typhi* SLT.1 yang berasal dari Salatiga berada dalam satu *clade* dengan strain BA07.4 dan EM.3 yang keduanya berasal dari kota Semarang dengan nilai similaritas nukleotida penyusunnya sebesar 98,83% dan EM.3 (nilai similaritas 98,74%), dengan perbedaan nukleotida penyusunnya sebanyak 14-15 nukleotida.



Gambar 2. Pohon filogeni yang direkonstruksi berdasarkan *Algoritme Neighbour Joining* yang menunjukkan hubungan kekerabatan antara 10 strain *S. typhi* Isolat Jawa Tengah dan Yogyakarta berdasarkan sekuens gen flagellin *fliC*

Tabel 2. Matriks similaritas dan perbedaan nukleotida sekuens gen flagellin *fliC* 10 strain *S. typhi* isolat Jawa Tengah dan Yogyakarta.

Strain	<i>S. typhi</i> BA.07.4	<i>S. typhi</i> EM.3	<i>S. typhi</i> BA.07.3	<i>S. typhi</i> KD.30.3	<i>S. typhi</i> SA.02.2	<i>S. typhi</i> BET	<i>S. typhi</i> KD.27.2	<i>S. typhi</i> BA.07.5	<i>S. typhi</i> SRJ	<i>S. typhi</i> SLT.1	<i>S. paratyphi</i> NI995_04
<i>S. typhi</i> BA.07.4	---	11/1454	26/1447	29/1450	29/1452	29/1451	20/1452	11/1453	40/1453	14/1197	763/1395
<i>S. typhi</i> EM.3	99.24	---	25/1448	27/1451	32/1452	29/1452	20/1452	14/1453	37/1450	15/1194	765/1396
<i>S. typhi</i> BA.07.3	98.20	98.27	---	20/1447	37/1449	31/1447	27/1448	22/1446	44/1446	26/1188	764/1396
<i>S. typhi</i> KD.30.3	98.00	98.14	98.62	---	32/1450	32/1450	25/1450	23/1450	43/1447	27/1189	761/1393
<i>S. typhi</i> SA.02.2	98.00	97.80	97.45	97.79	---	38/1451	29/1452	31/1451	56/1453	37/1194	773/1403
<i>S. typhi</i> BET	98.00	98.00	97.86	97.79	97.38	---	18/1452	26/1450	47/1447	32/1191	756/1394
<i>S. typhi</i> KD.27.2	98.62	98.62	98.14	98.28	98.00	98.76	---	16/1451	40/1448	22/1192	763/1395
<i>S. typhi</i> BA.07.5	99.24	99.04	98.48	98.41	97.86	98.21	98.90	---	31/1451	8/1192	759/1393
<i>S. typhi</i> SRJ	97.25	97.45	96.96	97.03	96.15	96.75	97.24	97.86	---	40/1198	792/1414
<i>S. typhi</i> SLT.1	98.83	98.74	97.81	97.73	96.90	97.31	98.15	99.33	96.66	---	661/1191
<i>S. paratyphi</i> NI995_04	45.30	45.20	45.27	45.37	44.90	45.77	45.30	45.51	43.99	44.50	---

## Kesimpulan

Hasil analisis kekerabatan 10 strain *S. typhi* isolat Jawa Tengah dan Yogyakarta berdasarkan sekuens gen flagellin *fliC* menunjukkan bahwa satu strain *S. typhi* SLT.1 asal Salatiga (10%) adalah *S. typhi* serovar H1-j dengan gen flagellin *fliC* (1267 bp),



dan 9 strain *S. typhi* serovar H1-d dengan gen flagellin *fliC* (1452-1488bp). Strain *S. typhi* SLT.1 berkerabat dekat dengan Strain BA07.4 dan EM.3, serta terdapat keanekaragaman genetik pada 10 strain *S. typhi* asal Jateng dan Yogyakarta

### Ucapan Terimakasih

Ucapan terima kasih disampaikan penulis kepada Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi, Kementerian Pendidikan Nasional Republik Indonesia yang telah memberikan dana untuk penelitian Hibah Bersaing tahun anggaran 2014 melalui DIPA Kopertis VI Jawa Tengah

### Daftar Pustaka

- Alexan, AF. S. H. Mohamed and A.M. Ibrahim. 2009. Immune Response Elicited in Mice after Immunization with Flagellin from *Salmonella enterica* Serovar Enteritidis. *Global Veterinaria*. ISSN 1992-6197. 3 (6): 465-471
- Baker, S., K. Holt, E. van de Vosse, P. Roumagnac, S. Whitehead, E. King, P. Ewels, A. Keniry, F. Weill, D. Lightfoot, J. T. van Dissel, K. E. Sanderson, J. Farrar, M. Achtman, P. Deloukas, & G. Dougan. 2008. High-Throughput Genotyping of *Salmonella enterica* Serovar Typhi Allowing Geographical Assignment of Haplotypes and Pathotypes within an Urban District of Jakarta, Indonesia. *Journal of clinical microbiology*. 46 (5): 1741-1746
- Darmawati, S., L. Sembiring, W. Asmara, W.T. Artama. 2012a. Keanekaragaman Spesies Bakteri pada Kultur Darah Widal Positif Asal Kota Semarang Berdasarkan Karakter Fenotipik. Prosiding Semnas Fak. Pendidikan Jurusan Biologi UNS
- Darmawati, S., S. Anwar, R. Haribi. 2012b. Analisis Molekuler Profil Protein Pilli untuk Mengungkap Hubungan Similiraritas 26 Strain *Salmonella Typhi* Isolat Jawa. Prosiding Seminar Hasil-hasil penelitian ISBN : 978-602-18809-0-6. LPPM Universitas Muhammadiyah Semarang
- Darmawati, S. & S. Anwar. 2013. Imunogenisitas protein 58 kDa *Salmonella typhi* Isolat BA 07.4. Laporan Akhir penelitian Hibah Bersaing (Belum dipublikasikan).

- F. Hayashi, Smith KD, Ozinsky A, Hawn TR, Yi EC, Goodlett DR, Eng JK, Akira S, Underhill DM, Aderem A. 2001. The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5. *Nature*. 26: 1099-103
- Hamid, N. and S. K. Jain. 2008. Characterization of an Outer Membrane Protein of *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium That Confers Protection against Typhoid. *Clinical and Vaccine Immunology*. 15 (9): 1461-1671
- Jindal, G., R. Tewari, A. gautam, S. K. Pandey and P. Rishi. 2012. Immunological characterization of recombinant *Salmonella enteric* serova Typhi FliC protein expressed in *Escherichia coli*. *Original article. AMB Express a Springer Open Journal*. 2: 55
- Lau, S. K. P., Patrick C. Y. Woo, Clair Y. F. Chan, Wai-Lan Woo, Gibson K. S. Woo & Kwok-Yung Yuen. 2005. Typhoid Fever Associated with Acute Appendicitis Caused by an H1-j Strain of *Salmonella enterica* Serotype Typhi. *Journal of Clinical Microbiology*. 43 (3):1470-1474
- McQuiston, J. R., R. Parrenas, M. Ortiz-Rivera, L. Gheesling, F. Brenner, and P. I. Fields. 2004. Sequencing and Comparative Analysis of Flagellin Genes *fliC*, *fljB*, and *flpA* from *Salmonella*. *Journal of Clinical Microbiology*. 42(5): 1923-1932



