KKA
KK
158/10 Hid
p

LAPORAN AKHIR

HIBAH KOMPETITIF PENELITIAN KERJASAMA INTERNASIONAL

PENGEMBANGAN PROTOTIPE RAPID TEST (ICT-*S typhi*) BERBASIS PROTEIN ADHESI MEMBRAN LUAR DAN FIMBRIA *Salmonella typhi* DARI PENDERITA DEMAM TIFOID

MILIK
PERPUSTAKAAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA

Wahyu Hidayatiningsih
Eddy Bagus Wasito
Toshiro Shirakawa

UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA
2009

HALAMAN PENGESAHAN

---

1. Judul Penelitian : Pengembangan Prototipe *Rapid Test* (ICT- *S typhi*) Berbasis Protein Membran Luar dan Fimbria Dari Penderita Demam Tifoid.

2. Ketua Peneliti

a. Nama Lengkap	: Wahyu Hidayatiningsih, S.Si., M.Kes.
b. Jenis Kelamin	: Perempuan
c. NIP	: 132 231 077
d. Jabatan Struktural	: -
e. Jabatan Fungsional	: Peneliti
f. Fakultas/Unit Kerja	: Lembaga Penyakit Tropis
g. Pusat Penelitian	:LPPM –Universitas Airlangga
h. Alamat Kantor	: Jl Mulyorejo Kampus C Unair Surabaya
i. Telepon &faks/E-mail	: 031-5992445; wahyu_tdc@yahoo.co.id
j. Alamat Rumah	: Jl Sidotopo Wetan Baru 49 Surabaya
k. Telepon/Faks	: HP 0818595046

3. Jangka Waktu Penelitian : 2 (dua) Tahun

4. Pembiayaan :

a. Jumlah seluruh biaya yang diajukan ke Dikti : Rp 100.000.000,-

b. Jumlah biaya dari sumber pembiayaan lain : Rp 0,-

Surabaya, 20 Desember 2009

Mengetahui,
Ketua Lembaga Penyakit Tropis
Universitas Airlangga

Dr. Nasronudin, dr., SpPD-KPTI
NIP 140 159 073

Ketua Peneliti,

Wahyu Hidayatiningsih,S.Si, M.Kes.
NIP 132 231 077

Mengetahui
Ketua Lembaga Penelitian dan Pengabdian Masyarakat
Universitas Airlangga

Prof. Dr. Bambang Sektiari Lukiswanto, drh., DEA.
NIP 131 847 004

KATA PENGANTAR

Puji syukur kami panjatkan kehadirat Allah SWT karena rahmat dan karuniaNya, kami dapat menyelesaikan riset berjudul 'Pengembangan Prototipe Rapid Test (ICT-*S typhi*) Berbasiskan Protein Adhesi Membran Luar dan Fimbria *Salmonella typhi* dari Penderita Demam Tifoid' tahap pertama ini.

Terselesaikannya riset tersebut tidak terlepasnya dari bantuan berbagai pihak. Oleh karena itu, kami menyampaikan terima kasih atas bantuannya dan semoga hasil riset ini bermanfaat bagi kesejahteraan masyarakat Indonesia pada umumnya.

Begitu juga kami sampaikan terima kasih kepada universitas Airlangga, karena dukungannya berupa fasilitas sarana dan prasarana sehingga riset ini terselenggara dengan lancar. Sarana riset yang tersedia di Lembaga Penyakit Tropis (LPT) sebagai tempat kami menjalankan sebagian besar pekerjaan laboratorium.

Akhir kata, kami berharap semoga hasil riset ini menjadi inspirasi dan pedoman bagi masyarakat luas, sehingga tugas negara untuk mensejahterakan rakyat dapat terwujud.

Surabaya, Medio Desember 2009

Tim Peneliti

ABSTRACT

Background

Typhoid fever, a systemic fever disease caused by *Salmonella typhi*, has been a health problem, especially in developing countries including Indonesia. *Salmonella typhi* adhesin protein, outer membrane proteinC and fimbriaH have immunogenic potency to elicit immunity respond.

Aim of study

The general objective of this study was to find Outer Membrane ProteinC and FimbriaH from typhoid fever patients for developing of the diagnosis of typhoid fever.

Methods

(First Year of the Proposal Research)

The coding sequences of *ompC* and *fimH* genes were amplified by the polymerase chain reaction with two pairs of specific primer from *Salmonella typhi*. The PCR products were inserted into the *pHis1525* (Braunswigh,Germany) and cloned into *E coli DH10β* for characterizing of DNA target. After primary selection of recombinants by restriction endonuclease digestion BglII and NgoMIV, the sequences of the inserted gene fragments were confirmed by DNA sequence analysis. Expression was undertaken in *E coli DH10β*. Analyze of recombinant protein was undertaken by SDS-page and western blotting.

Results

The result of this study revealed that the full length of coding sequence of *ompC* and *fimH* gene were isolated from the *Salmonella typhi* of typhoid fever patients (sample 9) by with PCR and obtained band ± 1093 bp a for ompC gene and ± 935 bp for fimH gene.

Sample 9 of sequence of *ompC* gene coding area can be accessed in GeneBank with accession number AE014613.1 and AL627274 for nucleotide and NP804453.1 and NP456812.1 for protein. The full length of the coding sequence of ompC gene between the sequence at GeneBank had 99% homology with sequence accession number AE014613.1; AL627274 and NP804453.1; NP456812.1 (sequence from *Salmonella enteritica subspecies*

ABSTRACT

Background

Typhoid fever, a systemic fever disease caused by *Salmonella typhi*, has been a health problem, especially in developing countries including Indonesia. *Salmonella typhi* adhesin protein, outer membrane proteinC and fimbriaH have immunogenic potency to elicit immunity respond.

Aim of study

The general objective of this study was to find Outer Membrane ProteinC and FimbriaH from typhoid fever patients for developing of the diagnosis of typhoid fever.

Methods

(First Year of the Proposal Research)

The coding sequences of ompC and fimH genes were amplified by the polymerase chain reaction with two pairs of specific primer from *Salmonella typhi*. The PCR products were inserted into the pHis1525 (Braunswigh,Germany) and cloned into *E coli* DH10β for charaterizing of DNA target. After primary selection of recombinants by restriction endonuclease digestion BglII and NgoMIV, the sequences of the inserted gene fragments were confirmed by DNA sequence analysis. Expression was undertaken in *E coli* DH10β. Analyze of recombinant protein was undertaken by SDS-page and western blotting

Results

The result of this study revealed that the full length of coding sequence of ompC and fimH gene were isolated from the *Salmonella typhi* of typhoid fever patients (sample 9) by with PCR and obtained band ± 1093 bp a for ompC gene and ± 935 bp for fimH gene.

Sample 9 of sequence of ompC gene coding area can be accessed in GeneBank with accession number AE014613.1 and AL627274 for nucleotide and NP804453.1 and NP456812.1 for protein. The full length of the coding sequence of ompC gene between the sequence at GeneBank had 99% homology with sequence accession number AE014613.1; AL627274 and NP804453.1; NP456812.1 (sequence from *Salmonella enteritica* subspecies

enteritica serovar Typhi Ty2 and *Salmonella enteriica serovar Typhi CT18*) . The full length of the coding sequence of *fimH* gene between the sequence at GeneBank had 94% homology with sequence accession number AE014613.1 and AL627267.1 The recombinant protein of OmpC and FimH that encoded by recombinant plasmid pOmpC and pFimH from *Salmonella typhi* of typhoid fever patients was expressed in *E.coli DH10β.*

Conclusion

This study obtains OmpC and FimH recombinant protein encode by pOmpC and pFimH of *Salmonella typhi* of typhoid fever pateient. It reveals that OmpC and FimH recombinant protein that can be used as biomaterial for developing the diagnosis of typhoid fever.

Keywords : Outer membrane protein C, Fimbriae H, *Salmonella typhi,* Typhoid Fever

MILIK
PERPUSTAKAAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA

DAFTAR ISI

	Halaman
Halaman Judul	i
Lembar Pengesahan	ii
Kata Pengantar	iii
Abstract	iv
Daftar Isi	v
Daftar Tabel	vi
Daftar Gambar	vii
Daftar Lampiran	viii
Bab I. Pendahuluan	
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	2
1.3 Tujuan Penelitian	3
1.4 Manfaat Penelitian	4
Bab II. Bahan dan Metode Penelitian	5
Bab III. Hasil Penelitian	12
Bab IV.Pembahasan	22
Bab V.Kesimpulan	29
Daftar Pustaka	30
Lampiran	32

DAFTAR TABEL

Halaman

Tabel 3.1 Hasil Uji Biokimia Isolat Salmonella spp
dari Penderita Demam Tifoid... 13

Tabel 3.2 Hasil Analisis Primer FOC dan ROC............................... 14

Tabel 3.3 Hasil Analisis Primer FH dan RH.................................... 14

DAFTAR GAMBAR

Gambar 3.1 Pengecatan Gram Isolat *Salmonella typhi* 12

Gambar 3.2 Hasil kultur sel transforman pOmpC 17

Gambar 3.3 Hasil kultur sel transforman pFimH 17

LAMPIRAN

Lampiran 3.1 Hasil Penjajaran sekuens gen *ompC* dan *fim H* *Salmonella typhi*... 32

Lampiran 3.2 Hasil Penjajaran sekuens gen *ompC Salmonella typhi* Dengan database Protein di *genbank*....................... 42

Lampiran 3.3 Hasil Penjajaran sekuens gen *fim H Salmonella typhi* Dengan database Protein di *genbank*....................... 42

MILIK
PERPUSTAKAAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Salmonella typhi merupakan bakteri penyebab demam tifoid, suatu penyakit infeksi yang masih merupakan masalah kesehatan penting di negara berkembang termasuk Indonesia. Terdapat 16 juta kasus demam tifoid yang terjadi setiap tahun di seluruh dunia dengan angka kematian 600.000 (WHO, 2004).

Insiden rata-rata demam tifoid diperkirakan berkisar $150/10^5$/tahun di Amerika Selatan dan $1000/10^5$/tahun di beberapa negara Asia (Ivanof, 1995). Di Indonesia, angka kejadian demam tifoid berkisar antara 358/100.000 penduduk di pedesaan dan 810/100.000 penduduk di perkotaan. Peningkatan angka kesakitan sebesar 34% dari tahun 1981 sampai 1986 dengan angka kematian rerata secara nasional antara 2-3,5% (Handoyo, 1996). Di RSUD Dr Soetomo periode 1996-2000 telah dirawat 1.563 penderita demam tifoid dengan angka kematian 1,09% (Hamid, 2008; Prasetyo, 1998; Wardhani, 2005).

Upaya penanggulanan infeksi *Salmonella typhi* secara dini menjadi penting guna mencegah penyebaran yang lebih luas. Salah satunya adalah tersedia perangkat deteksi yang akurat, cepat, murah, spesifik dan sensitif. Spesifitas alat deteksi didasarkan kemampuannya membedakan infeksi *Salmonella typhi* atau lainnya. Demikian pula, sensitifitas alat deteksi didasarkan atas kepekaannya dalam mendeteksi titer antibodi atau antigen pada batas tertentu.

Salmonella typhi terdiri atas lipopolisakarida dan protein adhesin yaitu protein membran luar dan fimbria. Peranan protein adhesin (protein membran luar/Omp, fimbriae/Fim, lipopolisakarida) penting dalam patogenesis infeksi *Salmonella typhi* dan bersifat imunogenik (Forrest *et al*,1991; Satta *et al*.,1993; Mroczenski *et al*.,1989).

Pada penelitian di Mexico,Gam dkk (1991) menyebutkan bahwa protein 50 KDa OmpC sebagai protein utama (*outer membrane protein*) bakteri *Salmonella typhi* penyebab dari kejadian demam tifoid. Demikian pula pada penelitian yang dilakukan oleh Ismail dkk (1991) menyebutkan protein 50 kDa sebagai OmpC yang imunogenik untuk negara Malaysia. Sebaliknya penelitian protein membran luar *Salmonella typhi* di Indonesia (Jakarta, Malang, Surabaya) menyebutkan profil protein *Salmonella typhi* yang imunogenik berbeda dengan negara Malaysia, yaitu 36 kDa (Lucky et al., 1995, Santoso, 2002; Anggaini, 2002). Hal ini disebabkan karena galur *Salmonella typhi* yang berbeda atau HLA inang.

Demikian pula penelitian yang dilakukan oleh Santoso (2006) berhasil mengisolasi protein adhesin 36 kDa *Salmonella typhi* yang imunogenik. Eksplorasi lebih lanjut dari penelitian Santoso (2002) dilakukan pada penelitian ini. Ekspresi gen *ompC* dan *fimH* dihasilkan protein murni yang dapat digunakan sebagai sarana diagnostik.

Pengembangan sarana diagnostik cepat, sensitif, spesifik dan mudah penggunaannya menjadi sentral penelitian ini. Prototipe alat diagnostik didasarkan pada metode carik celup berbasis antigen protein membran luar dan fimbria *Salmonella typhi* untuk mendeteksi antibodi penderita demam tifoid. Keunggulan lain dari metode carik celup adalah dapat digunakan sebagai *rapid screening* pada kejadian luar biasa dengan biaya terjangkau sehingga penanggulangan penyebaran infeksi *Salmonella typhi* dapat dicegah. Selain tersebut diatas, carik celup sangat praktis tidak membutuhkan alat yang mahal.

1.2 Rumusan Masalah

Kekayaan sumber keanekaragaman hayati mikroorganisme di Indonesia merupakan lahan subur bagi inovasi bioproses seperti eksplorasi dan pengembangan alat diagnosis. Protein imunogenik protein membran luarC dan fimbriaH diperoleh dengan melakukan kloning gen penyandi *ompC* dan *fimH Salmonella typhi* dan ekspresinya yang selanjutnya dapat digunakan untuk mensintesis antibodi protein adhesin rekombinan tersebut pada hewan

coba dan kultur hibridoma. Protein adhesin isolat lokal yang mempunyai karakter khas tersebut hingga kini belum digunakan sebagai biomaterial untuk diagnosis demam tifoid. Berdasar urgensi kebutuhan alat diagnostik yang cepat, sensitif dan murah untuk pencegahan infeksi *Salmonella typhi*, maka diteliti dan dikembangkan:

a. Apakah gen penyandi *ompC* dan *fimH Salmonella typhi* koleksi lembaga penyakit tropis dapat disekuen urutan nukleotidanya dan diketahui homologi dengan sekuen yang ada di *genbank*.
b. Bagaimana ekspresi seluruh koding gen *ompC* dan *fimH Salmonella typhi* pada *E.coli DH10β* untuk mendapatkan protein rekombinan Protein Membran Luar C/OmpC dan FimbriaH/ FimH *Salmonella typhi* sebagai biomaterial untuk pengembangan diagnosis demam tifoid.

1.3 Tujuan Penelitian

1.3.1 Tujuan Umum Penelitian:

Penelitian ini bertujuan membuat alat diagnostik *Rapid Test* (ICT-*S typhi*) berbasis antigen protein membran luar dan fimbria *Salmonella typhi* lokal dari penderita demam tifoid.

1.3.2 Tujuan khusus penelitian tahun pertama:

a. Mengisolasi seluruh area koding gen *ompC* dan *fim H Salmonella typhi* lokal dengan teknik *Polymerase Chain Reaction.*
b. Mendapatkan sekuen seluruh koding gen *ompC* dan *fimH Salmonella typhi* lokal dari penderita demam tifoid.
c. Menganalisis homologi sekuen seluruh area koding gen *ompC* dan *fimH Salmonella typhi* lokal dari penderita demam tifoid.
d. Membuktikan ekspresi seluruh area koding gen *ompC* dan *fimH Salmonella typhi* lokal dari penderita demam tifoid pada *E.coli DH10β* untuk mendapatkan protein rekombinan Protein Membran LuarC dan FimbriaH *Salmonella typhi* sebagai biomaterial untuk pengembangan diagnosis demam tifoid.

1.3.3 Tujuan khusus penelitian tahun kedua :

e. Karakterisasi antigen rekombinan Protein Membran LuarC dan FimbriaH *Salmonella typhi.*

f. Produksi antigen rekombinan Protein Membran LuarC dan FimbriaH *Salmonella typhi.*

g. Pembuatan prototype Carik Celup (ICT-*S. typhi*) untuk mendeteksi antibodi Protein Membran luarC dan FimbriaH *Salmonella typhi* pada penderita demam tifoid.

1..4 Manfaat Penelitian

1.4.1 Manfaat teori

Manfaat bagi perkembangan Ilmu Biologi Molekuler Kedokteran adalah memberikan informasi tentang sekuen seluruh area koding, homologi, kloning, dan ekspresi gen *ompC* dan *fimH Salmonella typhi* lokal dari penderita demam tifoid.

1.4.2 Manfaat praktis

Manfaat praktis dari penelitian ini adalah menghasilkan protein rekombinan Protein Membran LuarC dan FimbriaH yang imunogenik *Salmonella typhi* lokal dari penderita demam tifoid yang dapat diproduksi dalam skala besar sebagai biomaterial untuk pengembangan diagnosis demam tifoid.

BAB II
BAHAN DAN METODE PENELITIAN

2.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksploratif laboratorik yang secara umum bertujuan untuk mendapatkan protein rekombinan Protein Membran LuarC dan FimbriaH *Salmonella typhi* dari penderita demam tifoid sebagai biomaterial untuk pengembangan diagnosis demam tifoid.

2.2 Sampel Penelitian

Sampel adalah isolat *Salmonella typhi* dari penderita demam tifoid koleksi Balai Besar Laboratorium Kesehatan Daerah Surabaya dan Lembaga Penyakit Tropis, Universitas Airlangga.

2.3 Bahan Penelitian

Bahan penelitian yang digunakan untuk identifikasi gen *ompC* dan *fimH* yaitu isolat *Salmonella typhi* dari penderita demam tifoid koleksi Balai Besar Laboratorium Kesehatan Daerah Surabaya dan Lembaga Penyakit Tropis, Universitas Airlangga, *primer* FOC 5'-CGCAGATCT-AAAGTTAAAGTACTGTCCCTCCT-3' dan ROC 5'-GCCGGC-GAACTGGTAAACCAGACCCAGCG 3' yang memproduksi 1143 pb, dan FH-5'CGCGGATCAAAATATACTCAGCGCTATTGCTGGC -3' dan RH5'-CATGGCCGGCATCATAATCGACTCGTAGATA-3'(Biolabs, Singapore) yang diperoleh 1008 pb serta *High Fidelity Platinum Taq DNA Polymerase* (Invitrogen), 100 bp DNA *Marker* (Takara,Jepang) *nuclease free water* (MP Bio), Ethidium Bromide (Sigma), agarose, 6x *loading dye solution* , dan *TBE buffer* 10 x 1lt (Fermentas).

Bahan penelitian yang digunakan untuk kloning gen *ompC* dan *fimH* yaitu produk PCR gen *ompC* dan *fimH* yang telah dipurifikasi, plasmid *pHis1525* (Braunswigh, Jerman), *E.coli DH10β* dan *Bacillus megaterium DSM310* (Braunswigh, Jerman), media LB (Merck), *Ampicillin* dan *Tetracylin* (Roche, Jerman), gliserol ,$CaCl_2$ (Merck).

Bahan penelitian yang digunakan untuk analisis struktur DNA plasmid rekombinan yaitu *DNA sequencing kit*, *primer forward* T7 5'-TAA

TAC GAC TCA CTA TAG GG-3' dan *primer reverse* 5'-TAG TTA TTG CTC AGC GG TGG-3' (Invitrogen), *High-Plasmid Purification Kit* (Roche, Jerman), pOmpC, pFimH , Enzim *Bgl II* dan *NgoMIV* (Biolabs, Singapore), *lamda DNA HindIII restricted Hae II*, agarosa, dan buffer TBE.

Bahan penelitian yang digunakan untuk purifikasi protein rekombinan OmpC dan FimH yaitu kultur transforman *E.coli DH10β* yang mengandung DNA plasmid rekombinan pOmpC dan pFimH, medium LB yang mengandung 100 μg/ml ampisilin, IPTG, GuHCL (6 M GuHCL, 0,1M NaH_2PO_4, 0,01M Tris-HCl pH 8), matrik *Ni-NTA*, bufer lisis (50 mM NaH2PO4, 300 mM NaCl, 10 mM imidazol, pH 8.0), buffer pencucian (50 mM NaHPO4, 300 mM NaCL, 20 mM imidazol,pH 8.0), buffer elusi (50 mM NaHPO4, 300 mM NaCl, dan 250 mM imidazol, pH 8.0.

Bahan penelitian yang digunakan untuk analisis fungsi protein rekombinan yaitu protein rekombinan OmpC dan FimH, Acrylamide (Biorad), Bisacrylamide (Biorad), Tris HCl (KPL), SDS (Biorad), Amonium persulfat (Biorad), 2-Mercaptoethanol (Biorad), Temed (Biorad), *Coomasie blue* R-250 (Biorad), Methanol absolute (Merck), *Prestain Protein Ladder plus* 10-250 kDa (Biorad), Glysine (Biorad), Tris Base (Biorad), *Hybond nitroselulose membran* (Amersam), BSA fraksi V (Sigma),*Marker Broad Range Rainbow* (Biorad), dan Substrat BCIP/NBT (KPL).

2.4 Instrumen Penelitian

Alat yang digunakan untuk penelitian adalah *Thermal cycler* (Perkin Elmer), *Mini Protean* 3 *Electrophoresis Cell* (BioRad), *Mini Trans Blot semidry* (BioRad), *Rocking table* (Metter), *Transluminator (UVP)*, *Power supply (Biorad)*, Mikropipet (Biorad), *spectrophotometer UV-Vis* (Beckmann), *microwave* (Hitachi), *microcentrifuge* (Beckmann), CO2 *incubator* (Thermolyne), *laminar flow hood (ESCO)*, *ultra sonicator* (Thermolyne), *shaker waterbath* (Thermolyne), *shaker* media (Thermolyne), timbangan *digital* (Metter), *sterilizer* (Tomy), *vaccum*, vortex (Thermolyne), DNA *Sequenser* (ABI Prism 310).

2.5 Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan di Lembaga Penyakit Tropis, Universitas Airlangga Surabaya mulai Januari 2009 sampai dengan Desember 2009.

2.6 Prosedur dan Pengumpulan Data

Pencatatan data dilakukan selama penelitian sesuai dengan prosedur kerja penelitian yang meliputi persiapan, identifikasi, isolasi dan kloning area koding gen *ompC* dan *fimH Salmonella typhi*, analisis DNA rekombinan, ekspresi, purifikasi dan analisis protein rekombinan.

2.7 Persiapan

2.7.1 Desain *primer*

Desain *primer* dilakukan menggunakan *Software Clone Manager.* Data sekuen gen *ompC* and *fimH* diperoleh dari *genbank entrez nucleotide* http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez. Sekuen tersebut meliputi sekuen DNA yang menyandi *ompC* dengan *accession number* yaitu CAA30688; AL627274.1; XO7835.1; AE014613 dan sekuen yang menyandi gen *fimH* dengan *accession number* *AE014613.1,* AL627267.1. Sekuen tersebut digunakan sebagai dasar dalam desain *primer.*

2.7.2 Amplifikasi dengan PCR

PCR dilakukan dengan sepasang primer yaitu dengan *forward primer* FOC 5'-CGCAGATCT-AAAGTTAAAGTACTGTCCCTCCT-3' dan ROC 5'-GCCGGC-GAACTGGTAAACCAGACCCAGCG 3' (Biolabs, Singapore), yang memproduksi 1143 pb. Pasangan primer untuk gen penyandi *fimH* yaitu FH 5'-CGCGGATCAAAATATACTCAGCGCTATTGCTGGC-3' dan RH 5'-CATGGCCGGCATCATAATCGACTCGTAGATA-3' (Biolabs, Singapore).

Master mix untuk reaksi amplifikasi adalah 10X *high fidelity PCR buffer* 5μl, 10 mM dNTP mix 4 μl, 50 mM MgSO4 1 μl, *primer forward* 1 μl (50 pmol/μl), *primer reverse* 1μl (50 pmol/μl), *template* DNA 5μl, *platinum tag high fidelity* 0,5μl, *distilled water* sampai volume total 50μl. Kondisi PCR yaitu *predenaturasi* pada 96°C selama 5 menit, *denaturasi* pada 96°C selama 1 menit, *annealing* pada 60°C 1 menit, *extension* pada 72°C 1 menit, 35 siklus dan *final extension* pada 72°C selama 10 menit.

Hasil PCR dianalisis dengan gel elektroforesis pada gel agarose 1,5% yang mengandung *ethidium bromide*. 5 µl DNA ditambahkan 2 µl *loading dye* dimasukkan pada sumuran agarose. Kemudian dijalankan dengan tegangan 100 volt selama kurang lebih 30 menit. Selanjutnya dideteksi dengan UV-transluminator dan difoto dengan kamera polaroid.

2.7.3 Purifikasi

Produk PCR yang dihasilkan harus dipurifikasi terlebih dahulu untuk persiapan kloning. Apabila hasil visualisasi didapatkan *extra band*, maka terlebih dahulu produk PCR di*running* pada agar *low melting* 1,5% lalu *band* yang diinginkan diambil dengan pemotongan, setelah itu baru dilakukan purifikasi menggunakan *Gel PCR Purification kit* (Qiagen). Tahapan purifikasi adalah potongan pita dimasukkan ke dalam *tube* lalu ditambahkan bufer QG sebanyak 300 µl/*tube*. *Tube* dipanaskan 55°C selama 10 menit. Setelah itu ditambahkan isopropanol sebanyak 100 µl/ *tube* dan dicampur merata dengan *pipeting*. Setelah itu larutan tersebut dimasukkan pada kolom, lalu disentrifus 12.000 rpm selama 1 menit. Cairan *flow through* dibuang, lalu ditambahkan bufer PE sebanyak 750 µl/*tube*, disentrifus 12.000rpm selama satu menit dan cairan *flow through* dibuang. *Tube* disentrifus kembali untuk menghilangkan sisa-sisa kotoran yang masih tertinggal. Setelah itu ditambahkan *distillated water* sebanyak 20-50 µl/*tube*, lalu disentrifus 12.000rpm selama satu menit dan produk PCR yang telah dipurifikasi ditampung dan siap untuk digunakan kloning.

2.7.4 Kloning gen penyandi *ompC* dan *fim H Salmonella typhi*

2.7.4.1 Insersi gen penyandi *ompC* dan *fimH* ke *pHis 1525*

Hasil purifikasi produk PCR dikloningkan pada vektor ekspresi *pHis1525* yang mempunyai penanda histidin untuk memudahkan purifikasi protein rekombinan. Campuran reaksi yaitu 1µl buffer, 1,5µl produk PCR, dan 0,5µl vektor yang dicampur dengan pipet. Volume total 3µl. Diinkubasi pada es selama 5 menit kemudian langsung ditransformasi ke *E.coli DH10β* untuk karakterisasi DNA target.

2.7.4.2 Transformasi ke dalam *E.coli DH10β*

E.coli DH10β diinokulasi pada media 500 ml LB cair, kemudian dilakukan *shaker* kurang lebih 2 jam pada suhu 37^{0}C sehingga didapatkan OD_{600} sekitar 0,4-0,6. Sel inokulum kemudian direndam es selama 30 menit, lalu disentrifugasi dengan kecepatan 4000rpm. Supernatan dibuang dan pelet yang berisi *E.coli DH10β oli* dicampur dengan $CaCl_2$ steril 100mM dingin sebanyak 50ml. $CaCl_2$ dicampur perlahan dengan pelet *E coli* kemudian diletakkan dalam es selama 30 menit dan digoyang sesekali. Kemudian dilakukan sentrifugasi dengan kecepatan 3000 rpm dan kemudian pelet dikoleksi. Pelet ditambah $CaCl_2$ 100mM sebanyak 10 ml, diresuspensi dan didiamkan selama 1-2 jam pada es, lalu dialiquot dan disimpan pada -80^{0}C sampai akan digunakan. Sel kompeten *E.coli DH10β* siap digunakan untuk transformasi.

Transformasi DNA target ke *E.coli DH10β* dengan cara: aliquot *ligation mix* (3µl) ditransfer ke 200µl sel kompeten *E.coli DH10β* dengan berhati-hati dan dibiarkan pada es selama 30 menit. *Tube* dipindahkan ke *water bath* 42^{0}C selama 45detik untuk *heat shock*, kemudian direndam pada es selama 5 menit. Setelah itu kemudian ditambahkan 900µl media LB cair pada suhu kamar dan diinkubasi selama 60 menit pada water bath suhu 37^{0}C, kemudian diambil 25µl, 50µl dan 75µl untuk disebar pada media LB padat yang mengandung 100µg/ml ampicilin, kemudian dikultivikasi pada inkubator suhu 37^{0}C selama 16 jam. Kontrol negatif menggunakan *E.coli* yang sama namun ditransformasi dengan *destilated water* dengan prosedur yang sama pula.

2.7.4.3 Isolasi Plasmid

Sel transforman yang mengandung DNA target diinokulasi pada 10ml media LB cair yang mengandung ampicilin 100mg/ml. Kultur diinokulasi semalam (*overnight*) dalam *shaker incubator* pada 37^{0}C dengan shaker 200 rpm.

Isolasi DNA plasmid dilakukan dari hasil kultur yang berumur 24 jam dengan menggunakan kit *High Pure IsolatonPlasmid kit* (Roche, Jerman). Hasil berupa DNA rekombinan atau plasmid rekombinan yang siap untuk

digunakan analisis sekuen dan restriksi dan siap ditransfromasikan ke *E.coli DH10β* untuk uji ekspresi.

2.7.4.4 Analisis plasmid rekombinan *ompC* dan *fimH*

Analisis plasmid rekombinan yaitu analisis sekuen nukleotida dari DNA target yang terdapat pada plasmid untuk mengetahui keberhasilan kloning. Analisis ini meliputi uji restriksi dengan enzim restriksi dan sekuensing yang meliputi analisis bioinfomatika dan analisis homologi.

2.7.4.5 Restriksi plasmid rekombinan *ompC* dan *fimH* dengan enzim *Bgl II* dan *NgoMIV*

Restriksi plasmid rekombinan *ompC* dan *fimH* dilakukan menggunakan enzim *Bgl II* dan *NgoMIV* yang memotong pOmpC dan pFimH. Hasil restriksi berupa pita dua *band.* Campuran reagen adalah 7μl *double destiled water*, 2μl *digest buffer*, 10μl DNA plasmid, 1μl *Bgl II* dan *NgoMIV* dengan total volume 20μl. *Reaction mix* dicampur dengan pipet kemudian diinkubasi pada suhu 37^{0}C selama 60 menit. Hasil restriksi kemudian dielektroforesis dengan agarose 1% yang mengandung *ehtidium bromide* pada 50 volt dan divisualisasi dengan gel dok camera (kodak).

2.7.4.5 Sekuensing plasmid rekombinan Protein Membran LuarC dan FimbriaH *Salmonella typhi*

Sekuensing plasmid rekombinan Protein Membran LuarC dan Fim-briaH *Salmonella typhi* pada penelitian ini menggunakan DNA *Sequenser* ABI PRISM 310 dengan metode Sanger. *Primer* yang digunakan adalah *primer forward* T7 5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3' dan *primer reverse* 5'-TAGTTATTGCTCAGCGGTGG-3'. Hasil sekuensing dianalisis bioinformatika dan homologi. Analisis bioinformatika meliputi analisis data sekuen gen *ompC* dan *fimH Salmonella typhi* dari penderita demam tifoid dengan *Software Clone Manager*, penelusuran data gen penyandi *ompC* dan *fimH* di *genbank*, analisis karakter protein rekombinan Protein Membran LuarC dan FimbriaH *Salmonella typhi* melalui situs *Expasy ProtParam* (Gasteiger E *et al*, 2003) di http://www.expasy.ch/tools/ protparam. html, dan analisis hidrofobositas dengan *software Genetyc-Win.* Analisis homologi

dilakukan pada situs *European Bioinformatic Institute* http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/.

Pelabelan dan presipitasi untuk sekuensing dengan menggunakan kit *Bigdye Terminator v1.1 cycle sequensing kit.* Campuran reagen yang digunakan untuk *labelling* produk PCR yaitu 4µl *Ready Reaction Premix* (2,5X), 2µl *Big dye sequencing buffer* (5X), 1µl *primer* (4pmol), 5µl sampel hasil purifikasi, 8µl *double destilated water.* Volume total 20µl. Mineral oli diteteskan di atas *mix* larutan tersebut. Kondisi labeling yaitu *predenaturasi* 95°C 1 menit, *denaturasi* 96°C 30 detik, *annealing* 50°C 15 detik, *extension* 60°C 4 menit, 25 siklus.

Hasil pelabelan kemudian dipresipitasi. Mencampurkan reagen 2,5µl EDTA, 5µl sodium asetat, dan 50µl alkohol dengan pipet. Mengambil semua produk yang telah dilabel, dipisahkan dari mineral oil dengan meneteskan pada parafilm. Produk yang telah terpisah dengan mineral oil diambil kemudian dimasukkan ke *tube* di langkah 1. Campur dengan pipeting kemudian diinkubasi pada suhu ruang selama 10 menit. Sentrifuse 15.000 rpm, 30 menit, pada 4°C dan supernatan dibuang. Menambahkan alkohol 70% 100 µl. Disentrifuse 15.000 rpm 15 menit, 4°C kemudian supernatan dibuang. *Tube* dikeringkan dengan *speed vacuum* selama 15 menit. Menambahkan 25 µl HD Formanide kemudian dipanaskan pada 95°C 5 menit. Didinginkan pada es selama 10 menit kemudian dimasukkan mesin sekuensing. Sekuensing dilakukan dengan alat DNA *sequenser* (ABI Prism 310).

2.8 Analisis Hasil Penelitian

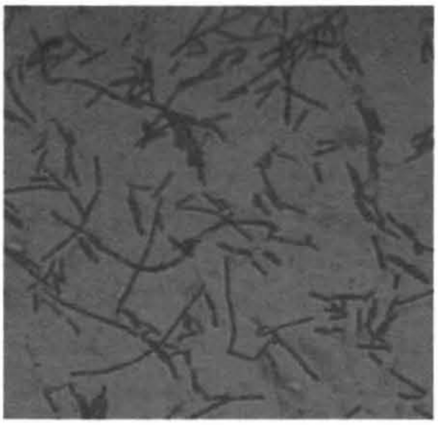
Penelitian ini merupakan penelitian diskriptif sehingga tidak memerlukan analisis statistik. Data yang diperoleh disajikan dalam bentuk narasi dan gambar.

BAB III

HASIL PENELITIAN

3.1 Kultur Stok dan Identifikasi *Salmonella typhi*

Empat puluh dua stok *Salmonella typhi* dikultur ulang dan diidentifikasi dengan pengecatan Gram dan API 20 E. Hasil yang menunjukkan positif *Salmonella typhi* adalah sampel no 8,9,34,35,37,38.



Gambar 3.1 Pengecatan Gram Isolat *Salmonella typhi*

3.2 Hasil Identifikasi biokimia isolat *Salmonella spp*

Empat puluh empat sampel dilakukan pengujian ulang dengan 21 item reaksi biokimia yang menghasilkan 6 sampel isolat yang sama karakternya dengan *Salmonella typhi* (tabel 3.1).

3.3 Desain Primer

Desain *primer* dilakukan menggunakan *Software Clone Manager* dengan data sekuen gen *ompC* dan *fimH Salmonella typhi* dari *GeneBank entrez nucleotide* http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez. Sekuen tersebut meliputi sekuen DNA yang menyandi ompC dengan *accession number* yaitu AE014613.1, AL627274.1,M31424.1, FJ009676.1 dan sekuen fimH yang menyandi FimbriaH dengan *accession number X*.

Berdasarkan sekuen tersebut kemudian didesain *primer* oligonukleotida untuk identifikasi gen *ompC* yaitu FOC 5'-CGCAGATCT-AAAGTTAAAGTACTGTCCCTCCT-3' dan ROC 5'-GCCGGC-

GAACTGGTAAACCAGACCCAGCG- 3' (Biolabs,Singapore). Gen *fimH* digunakan primer FH 5-CGCGGATCAAA TATACTCAGCGCTATTGCTGGC-3' dan RH 5' CATGGCCGGCATCATAATCGACTCGTAGATA- 3'. Pasangan *primer forward* dan *reverse* mengamplifikasi DNA *ompC* dan *fimH Salmonella typhi* menghasilkan produk 1143 dan 1008 pb.

Tabel 3.2 Hasil analisis *primer* FOC dan ROC

	Primer Forward	*Primer Reverse*	Comment
Primer	FOC	ROC	-
Sequence	CGCAGATCT- AAAGTTAAAG TACTGTCCCTCCT	GCCGGC-GAACTGG TAAACCAGACCCAGCG	-
Primer evaluation			
Lenght	32	29	3 bases diference
%GC	43	55	12 % difference
Tm ^{0}C	60^1 69^2	67^1 77^2	7^1 8^2 C difference
3'Dimer	2	2	A:B 2
Dimer-Any	6	6	A:B 4
Stability (kcals)	0,3	-0,9	Low selectivity
Run of bases	3	3	-
Repeats(dinuc)	None	None	-
Hair pains	None	None	-

Tabel 3.3 Hasil analisis *primer* FH dan RH

	Primer Forward	*Primer Reverse*	Comment
Primer	FH	RH	-
Sequence	CGCGGATCAAAA TATACTCAGCGC TATTGCTGGC	CATGGCCGGCAT CATAATCGACTC GTAGATA	-
Primer evaluation			
Lenght	34	31	3 bases diference
%GC	50	48	2 % difference
Tm ^{0}C	65^1 73^2	54^1 70^2	11^1 3^2 C difference
3'Dimer	2	2	A:B 3
Dimer-Any	6	6	A:B 3
Stability (kcals)	1,1	2,1	Low selectivity
Run of bases	4	2	Runs found
Repeats (dinuc)	2	None	-
Hair pains	None	None	-

MILIK
PERPUSTAKAAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA

Tabel.3.1 Hasil Uji Biokimia Isolat *Salmonella spp* dari Penderita Demam Tifoid

NO		ISOLAT																							
		8	9	17	18	19	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	37	38	40	41	42
1	Glukosa	+	+	+	+	-	-	+	-	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+
2	Nitrat	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3	Lysine	+	+	-	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+
4	Orenthine	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-
5	Sorbitol	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
6	Manitol	+	+	+	+	-	-	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+
7	Arabinose	+	+	-	-	+	-	+	+	-	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+	+	-	+	+
8	H_2S	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
9	Indole	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-
10	Urease	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
11	Arginin	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
12	Sacarose	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
13	Raff	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-
14	Rhamnose	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-
15	Malonate	-	-	+	+	-	+	-	-	+	-	-	-	+	-	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-
16	TDA	-	-	-	+	-	+	-	-	+	-	-	-	+	-	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-
17	Vp	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
18	Citrate	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
19	Inositole	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-
20	Adalose	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
21	ONPG	-	-	-	+	-	+	-	-	+	-	-	-	+	-	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-

Keterangan : Tanda + = hasil biokimia yang menunjukkan reaksi positif yang ditandai dengan perubahan warna media uji sesuai petunjuk pabrik

Tanda - = hasil biokimia yang menunjukkan reaksi negative yang ditandai dengan perubahan media uji sesuai dengan petunjuk pabrik

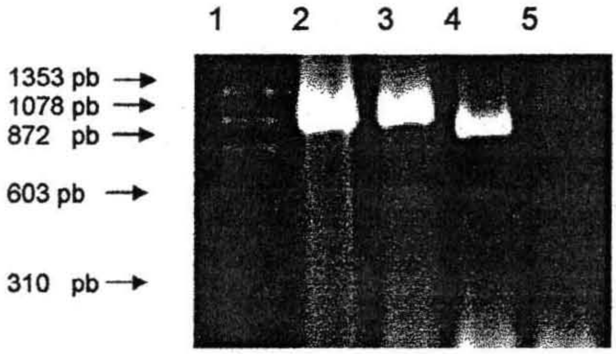
(Media biokimia yang digunakan adalah API 20E Biomeuriux)

3.4 Isolasi Seluruh Area Koding Gen *ompC* dan *fimH* *Salmonella typhi*

Amplifikasi seluruh area koding gen *ompC* dan *fimH* *Salmonella typhi* diperlukan untuk analisis gen penyandi protein OmpC dan FimH yang dilakukan dengan PCR. Berdasarkan hasil optimasi kondisi PCR yang digunakan pada penelitian ini adalah untuk amplifikasi gen *ompC* yaitu *predenaturasi* dilakukan pada 96^0C selama 5 menit 1 siklus, denaturasi 96^0C selama 1 menit, *annealing* 60^0C selama 1 menit dan *extension* 72^0C selama 1 menit, selama 35 siklus, kemudian *final extension* pada 72^0C 10 menit. Hasil PCR dengan menggunakan *primer* FOC dan ROC menunjukkan *band* sekitar 1100 pb. Hasil optimasi PCR dengan primer FH dan RH adalah *predenaturasi* dilakukan pada 96^0C selama 5 menit 1 siklus, *denaturasi* 96^0C selama 1 menit, *annealing* 58^0C selama 1 menit dan *extension* 72^0C selama 1 menit, selama 35 siklus, kemudian *final extension* pada 72^0C 10 menit menunjukkan *band* sekitar 1000 pb. Produk PCR dielektroforesis kemudian divisualisasikan dengan UV-transluminator dan didokumentasikan dengan kamera polaroid yang ditampilkan pada Gambar 3.2.

Produk PCR yang dihasilkan dipurifikasi terlebih dahulu dengan menggunakan *Gel Extraction Kit* (Qiagen) untuk persiapan kloning. Hasil visualisasi produk PCR pada elektroforesis didapatkan *extra band*, sehingga sebelum purifikasi terlebih dahulu dilakukan *running* produk PCR pada agar *low melting* 1,5%, pita yang diinginkan diambil dengan pemotongan lalu dicampur dengan *buffer* QG. *Buffer* ini mengandung pH indikator. Pengikatan yang optimal antara DNA terhadap membran silika gel membutuhkan pH $\leq$ 7,5. yang akan memberikan warna kuning. Tetapi jika pH terlalu tinggi, maka akan dihasilkan warna ungu (Qiagen, 2002). Setelah DNA terikat pada membran, dilanjutkan dengan proses pencucian DNA untuk menghilangkan *unwanted primer* dan pengotor lain seperti garam-garam, sisa enzim, agarosa, pewarna, etidium bromida, *mineral oil* dan deterjen yang tidak terikat pada membran silika gel. Penambahan *buffer* PE yang mengandung ethanol, membuat pengotor akan mengalir keluar dari matrik kolom melalui tahapan sentrifugasi. DNA yang terikat pada membran dielusi dengan penambahan *buffer* elusi sebanyak 50μl tepat pada bagian

tengah dari membran dan DNA purifikasi yang didapat sebagian dielektroforesis untuk mengetahui keberhasilan tahapan purifikasi dan siap digunakan untuk kloning.



Gambar 3.2. Hasil elektroforesis PCR seluruh area koding gen ompC dan fimH dari isolat *Salmonella typhi* 1= *Marker φ x 174 RF DNA /Hae III fragments*, 2= produk PCR sampel no 8 *ompC* (± 1200 bp), 3= produk PCR sampel no 9 *ompC* (± 1100 bp), 4= produk PCR sampel no 8 *fimH* (± 1000 bp),5 = produk PCR sampel no9 *fimH* (± 1000 bp).

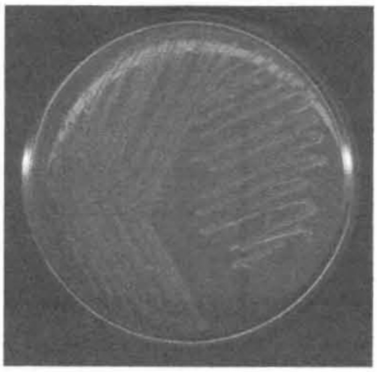
3.5 Kloning Gen Penyandi *ompC* dan *fimH Salmonella typhi*

3.5.1 Insersi gen penyandi *ompC* dan *fimH* ke *pHis1525*

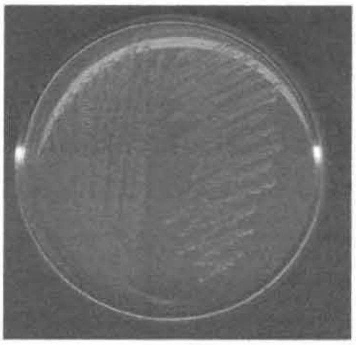
Produk PCR yang telah dipurifikasi kemudian diinsersikan ke plasmid. Plasmid yang digunakan yaitu *pHis1525* dengan cara memotong plasmid sirkuler dan produk PCR tersebut dengan enzim *Bgl II* dan *NgoMIV*. Hasil ligasi kemudian dilakukan transformasi ke inang *E.coli DH10β.*

3.5.2 Transformasi ke dalam *E.coli DH10β*

Hasil insersi ditransformasikan ke dalam *E.coli DH10β* kemudian dikulturkan pada media Luria Bertani (LB) mengandung ampisilin (100 μg/ml). Sel transforman *E.coli DH10β* yang mengandung plasmid rekombinan pOmpC dan pFimH.



Gambar 3.3 Hasil kultur sel transforman *E.coli DH10β* yang mengandung plasmid rekombinan pOmpC



Gambar 3.4 Hasil kultur sel transforman *E.coli DH10β* yang mengandung plasmid rekombinan pFimH

3.6 Sekuensing plasmid rekombinan pOmpC dan pFimH

Sekuensing pada penelitian ini dilakukan dari hasil isolasi plasmid klon *E.coli DH10β* yang mengandung plasmid rekombinan pOmpC dan pFimH dengan menggunakan *primer forward* T7 5'-TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG-3' dan *primer reverse* T7 5'-TAG TTA TTG CTC AGC GGT GG-3'.

Hasil sekuensing dianalisis bioinformatika dan analisis homologi. Analisis bioinformatika meliputi analisis data sekuen gen *ompC* dan *fimH* hasil kloning dari isolat *Salmonella typhi* no 8 dan 9 dengan *Software Clone Manager*, penelusuran data gen penyandi *ompC* dan *fimH* dan asam amino OmpC dan FimH di *genbank*, analisis karakter protein rekombinan OmpC dan FimH melalui situs *Expasy ProtParam* (Gasteiger E *et al*, 2003) di http://www.expasy.ch/tools/ protparam.html.

Sekuen gen *ompC* dan *fimH* hasil kloning dari isolat *Salmonella typhi* no 8 dan 9 hasil dari penelitian ini sudah terdaftar pada *genbank entrez nucleotide* http://www.ncbi.nlm.nih. gov/sites/entrez dengan *accession number* AE014613 dan AL627274.1 untuk nukleotida ompC dan NP455136 dan NP456812.1 untuk protein OmpC. Demikian pula, hasil sekuensing gen *fimH* mempunyai homologi dengan *accession number* AE014613 dan AL627267.1 untuk nukleotida *fimH* dan NP455136; ABK76650.1 dan YP215573.1 untuk protein FimH. Hasil tersebut ditunjukkan pada lampiran 3.1.

3.6.1 Pengurutan nukleotida Hasil PCR sampel 8 (*ompC*)

a. *Forward Sequences* (±231 bp)

```
ctggatacca   gctctgctgg   agggggcgca   gcgattgcgg
ctgaaattat   aataaagacg   gaaacaaatt   agacctgttt
ggtaaagttg   atggcctgca   ctacttctct   gacgacaaag
gcagcgacgg   cgaccagacc   tacatgcgta   tcggcttcaa
aggctaaacg   caggttaacg   atcttctgac   cggttatccc
cagtgggaat   tttttttccg   ggcaacctta   t
```

b. *Reversed Sequences* (± 427 bp)

```
tgctacgatg   tcgtcggtgt   tgacggccgc   agcgcgggta
aagtcgtttt   tatccagcag   gttgattttg   taatcaacat
aggtggacat   aagtcgtttt   aagtagtaag   tcgcgccgac
atcaacgtat   tttacgatgt   cctggtcgcc   atagctggcg
ccgtagccgt   tgctgatcga   cttaccttta   gactgcaggt
aagccacaga   cggacgcaga   ccaaagtcga   actggtactg
agcaaccact   tcaaagttct   gcgctttgtt   gccaaaaccg
taagattttt   gattggttgc   tgccgttgat   agtgttgcgt
tatatgtctg   aaaatactgc   gctgccatat   aaatgttgat
ctcacctatt   tcacgccacc   agtgaaaacc   gagacgagat
ctctgttaca   gtataggtga   gcttaa
```

3.6.2 Pengurutan Nukleotida Hasil PCR sampel 9 ompC (± 1093 bp)

tggtacagct ctgctggtgg cgggcgcagc gaatgcggct
gaaatttata ataaagacgg caacaaatta gacctgtttg
gtaaagttga tggcctgcac tacttctctg acgacaaagg
cagcgacggc gaccagacct acatgcgtat cggcttcaaa
ggcgaaacgc aggttaacga tcagctgacc ggttatggcc
agtgggaata tcagattcag ggcaaccaga ctgaaggcag
caacgactcc tggacgcgtg tggcgtttgc gggtttgaaa
tttgctgacg caggtccctt cgattatggt cgtaaattac
ggcgtaacct atgacgtgac ctcctggacc gacgttctgc
cggagttcgg cggcgacacc tacggcgctg acaactttat
gcagcagcgt ggtaacgggc tatgctacct accgtaacac
cgacttcttc ggtctggtgg atggtctgga cttcgcgttg
cagtatcagg gcaaaaacgg cagcgtgagc ggtgaaaaca
ccaacggtcg cagcctgctg aaccagaacg gcgacggtta
cggcggatcg ctgacttatg caatcggcga aggcttctcc
gtcggtggcg ctatcaccac gtctaaacgt actgccgatc
agaacaacac cgctaacgct cgcctgtatg gtaacggcga
tcgcgccacg gtttacaccg gcggcctgaa atacgatgcg
aacaacatct atctggcagc gcagtattct cagacctata
acgcaacccg ttttggtacc ttctacggca gcaacccgtc
cacctcttac ggttttgcca acaaagcgca gaactttgaa
gtggttgctc agtaccagtt cgactttggt ctgcgtccgt
ctgtggctta cctgcagtct aaaggtaagg acatcagcaa
cggctacggc gccagctatg gcgaccagga catcgtaaaa
tacgttgatg tcggcgcgac ttactacttc aacaaaaaca
tgtccaccta tgttgattac aaaatcaacc tgctggataa
aaacgactta cccgcgatgc gggcatcaac accgacgaca
tcgtaga

3.6.3 Pengurutan Nukleotida Hasil PCR sampel 8 fimH (± 911 bp)

attacaaacg ggacggcgac cgatatcttt tatgacctgt
cagatgtttt caccagcggc aataatcagc cgggacaggt
ggtgacgctg ctgaaaaaat cagattggtg cggcgtaaac

gcgacgtgcc	cggcggggac	aacggtgaat	tatacctacc
gaagctatgt	atcagaatta	ccggtacaaa	gcaccgaagg
aaattttaaa	tacctcaagt	tgaatgacta	ccttctgggc
gcgatgagca	taaccgatag	tgtcgctggc	gtattttatc
cgccccgtaa	ctatattcgc	atgggcgtcg	acttcaacgt
gtcgcagcaa	aagccgtttg	gcgtgcagga	ctcaaagctg
gtttttaaat	taaaaagtga	tactgccttt	ttattaatat
agtgacgatc	ccccgccaga	caatgtttat	ccgtctaagt
gacgacctct	accggcgacg	cgttgagcac	gccggtgtat
accattagct	acagcggcaa	agtggaagta	ccgcaaaact
gtgaagtgaa	tgccggacag	gtcgtggagt	ttgatttcgg
cgatatcggc	gcgccgttat	ttagtcaggc	gggagcgggt
aatcgtccgc	aaggcgtcac	gccgcaagcg	aaaactatcg
ctatcaaatg	taccaacgtc	gcggcgcaag	cctatttatc
gatgcggctt	gaagccgaaa	aggcctcagg	gcaggcgatg
gtgtccgata	acccggattt	aggctttgtg	gttgctaata
gcaacggtac	gccgctcaca	cccaataatt	tgtcgagtaa
aattccgttt	catcttgatg	ataacgccgc	cgctcgcgta
ggtattcgcg	cctggccgat	caacgtgaca	gggaataaac
cggcggaaga	ccgtttactg	cgggcaagca	t

3.6.4 Pengurutan Nukleotida Hasil PCR sampel 9 fimH (± 935 bp)

Agaaaaagaa	ccttcccgtg	caggcgacgg	acgtcgtaat
tggggcggga	cggcgaccga	tatcttttat	gacctgtcag
atgttttcac	cagcggcaat	aatcagccgg	gacaggtggt
gacgctgctg	aaaaaatcag	attggtgcgg	cgtaaacgcg
acgtgcccgg	cggggacaac	ggtgaattat	acctaccgaa
gctatgtatc	agaattaccg	gtacaaagca	ccgaaagaaa
ttttaaatac	ctcaagttga	atgactacct	tctgggcgcg
atgagcataa	ccgatagtgt	cgctggcgta	ttttatccgc
cccgtaacta	tattcgcatg	ggcgtcgact	ctaacgtgtc
gcagcaaaag	ccgtttggcg	tgcaggactc	aaagctggtt
tttaaattaa	aagtgatacg	gccttttatt	aatatagtga
cgatcccccg	ccagacaatg	tttaccgtct	atgtgacgac

```
ctctaccggc   gacgcgttga   gcacgccggt   gtataccatt
agctacagcg   gcaaagtgga   agtaccgcaa   aaactgtgaa
gtgaatgccg   gacaggtcgt   ggagtttgat   tttcggcgat
atcgggcgcg   ccgttatttt   agtcaggcgg   gagcgggtaa
tcgtccgcaa   ggcgtcacgc   cgcaagcgaa   aactatcgct
atcaaatgtc   caacctccct   ggcgcaagct   tatttatcga
tgcggctttg   aatcctaaaa   ggcctcaagg   caaggcaatg
gtgtctgata   accgggtatt   aggctctggg   gtatgtaata
agcacagacg   ccggctcata   cccaataatt   tgtcgagtaa
aattccgttt   catcttgatg   ataacgccgc   cgctcgcgta
ggtattcgtt   cccgtccgat   cagcatgcca   gggaaaaaca
gccctttct    gccgt
```

3.7 Analisis homologi

Analisis homologi dilakukan pada situs *European Bioinformatic Institute* http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/. Analisis sekuen hasil sekuensing gen *ompC* menunjukkan bahwa terdapat homologi 99 % dengan *accession number* AL627274, AE014613.1, M31424.1,FJ009676.1 (Lampiran 3.2).

Analisis homologi sekuen gen penyandi *fimh* pada penelitian ini dengan sekuen yang terdapat di *GeneBank* menunjukkan bahwa bahwa terdapat homologi 94% (Lampiran3.3)

BAB IV
PEMBAHASAN

5.1 Kultur dan Identifikasi *Salmonella typhi*

Kultur 42 stok bakteri *Salmonella typhi* yang dikoleksi dari RSUD DR.Soetomo dan Balai Laboratorium Kesehatan Daerah diverifikasi ulang guna mendapatkan validitas uji dalam menentukan spesies bakteri secara fenotipik yang akurat. Adapun langkah yang ditempuh adalah penanaman ulang 42 stok bakteri *Salmonella typhi* pada media selektif *Salmonella Shigella Agar* (SSA), pengecatan Gram, uji katalase dan reaksi API 20 E (Biomeurix). Pemilihan SSA disebabkan karena *Salmonella typhi* tidak mempunyai kemampuan dalam meragi laktosa sehingga tampak berwarna bening atau *colorless*. Koloni yang tumbuh dilakukan pengecatan Gram guna mengetahui bentuk, susunan serta sifat terhadap pengecatan Gram. *Salmonella typhi* adalah bakteri berbentuk batang, tipis, berukuran antara 2-4 x 0,2 µm, bersifat aerob dan Gram negatif atau memberi warna merah pada pengecatan Gram.

Selanjutnya dilakukan identifikasi dengan menggunakan API 20 E yang mempunyai spesifitas reaksi berdasarkan perubahan warna indikator dalam masing-masing media. Hasil fermentasi *Salmonella typhi* pada media uji akan menunjukkan hasil identifikasi yang akurat. Ketepatan dalam proses pemilihan koloni sangat menentukan ketepatan identifikasi API 20 E, karena jika terjadi kontaminasi dengan selain koloni *Salmonella typhi* maka intepretasi hasil pembacaan menjadi salah. Perubahan warna dalam media uji akan dianalisa oleh piranti lunak yang disediakan oleh kit API 20E.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa 6 isolat yang berasal dari 42 stok adalah *Salmonella typhi* pada nomor 8, 9,34,35,37,38.

5.2 Isolasi DNA (*High Pure DNA Template Isolation Kit -Roche*)

DNA genomik telah berhasil diisolasi dari 2 *Salmonella typhi* sesuai prosedur kit diagnostik Roche (http://www.roche-applied-science.com). Kondisi optimum yang dilakukan pada penelitian ini adalah menanam satu koloni bakteri pada empat mililiter Luria Bertani cair kemudian di-*shaker* dengan kecepatan 150-250 r/menit pada suhu 37°C selama empat jam. Setelah dilakukan kultur dengan kondisi optimum, pertumbuhan bakteri diukur kerapatan pertumbuhannya, dan jika sudah

mencapai 0,8 x 10^9 sel/ml atau satu unit *optical density* (OD) pada 600 nm dilakukan sentrifugasi untuk memisahkan supernatan dan *pellet Salmonella typhi* (Brown, 1991). Kemudian dilakukan isolasi DNA pada *pellet* dengan *High Pure DNA Template Isolation Roche.*

Isolasi DNA genom dengan *High Pure DNA Template Isolation Roche* mempunyai prinsip kerja yang spesifik. Kit tersebut menggunakan garam guanidium tiosianat sebagai bahan lisis sel bakteri yang efisien (Ausubel *et al*, 1996) dan inaktivasi enzim nuklease (Boom *et al.*, 1989). Metode isolasi DNA dengan menggunakan agen-agen khaotropik menunjukkan hasil dan kualitas DNA yang secara konsisten tinggi (Sambrook *et al.*, 2001). Bahan guanidium tiosianat akan mengikat DNA kemudian DNA disaring dan menempel pada kertas saring yang didesain pada tabung penampung (*filter tube*). Filter kertas saring mempunyai kapasitas pengikatan DNA lebih besar dari penyaring silica, yaitu tiap kolom mampu mengikat hingga 20 μg DNA.

Modifikasi yang dilakukan pada isolasi DNA dengan kit (*High Pure DNA Template Isolation Roche*) adalah tahapan lisis sel, yaitu menggunakan enzim lysozim sebelum dilakukan ekstraksi dengan kit tersebut. Hal ini didasarkan pada karakter dinding sel *Salmonella typhi* yang tidak tahan dengan kerja enzim lysozim, yaitu destruksi protein membran.

Kemudian setelah tahapan isolasi DNA, dilakukan pengukuran konsentrasi dan kualitas DNA. Pengukuran dilakukan secara spektrofotometri dan visualisasi pita-pita DNA pada agar elektroforesa. Tujuan dari pengukuran ini untuk mendapatkan *DNA template* dengan konsentrasi tertentu yang dibutuhkan pada proses amplifikasi DNA.

5.3 Desain Primer

Rancangan primer *ompC* dan *fimH* didasarkan pada urutan nukleotida *Salmonella typhi accession number* CAA30688; AL627274.1; XO7835.1; AE014613 untuk *ompC* dan *accession number* X untuk gen penyandi *fimH.* Perancangan primer FOC/ ROC dan FH/RH dilakukan dengan piranti lunak *Clone Manager Suite 6.0* dengan mempertimbangkan prosentase *GC content* yang tertinggi dan terendah, melakukan penyaringan homologi pada ujung 3' kedua primer untuk menghindari *mispriming* antar primer (*cross homology*) maupun primer yang sama (*self homology*).

MILIK
PERPUSTAKAAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA

Pada proses perancangan, primer didesain khusus sesuai dengan tujuan penelitian adalah kloning dan ekspresi gen penyandi outer membran protein C dan fimbriae H pada vektor plasmid, *pHis1525*, sehingga didapatkan tambahan nukleotida dibagian *upstream* dan *downstream* yang berguna sebagai *linker*.

Berdasarkan hasil analisis homologi diketahui FOC/ROC akan mengamplifikasi gen *ompC* sepanjang 1140 pasangan basa pada bagian *upstream* yang telah dihilangkan *start* dan *downstream* pada bagian *stop codon*nya. Penghilangan sekuen *start* dan *stop codon* karena desain plasmid *pHis1525* yang digunakan pada tahap rekayasa telah dipersiapkan (peta *pHis1525*). Begitu pula perancangan primer FH/RH, mengamplifikasi sepanjang 1020 pasangan basa. Ujung 5' primer ditambah dengan nukleotida, tempat pengenalan enzim *BglII* dan ujung 3' ditambah sekuen yang sesuai tempat pengenalan *NgoMIV*.

5.4 Amplifikasi Gen Penyandi *ompC* dan *fimH*

Gen *ompC Salmonella typhi* yang berhasil diamplifikasi sampel, 8 dan 9 dengan panjang 1093 pasangan basa, sedangkan gen *fimH* pada kisaran 935 pasangan basa. Optimasi *PCR* dilakukan guna mendapatkan kondisi yang optimal sehingga dapat mengamplifikasi DNA pada regio yang diinginkan. Kondisi optimal yang dilakukan antara lain *DNA template* pada konsentrasi 150 ng sebanyak 2,5 μl yang akan bereaksi optimum dengan masing-masing *primer* konsentrasi 3 μM sebanyak 2,5 μl. Desain oligonukleotida *forward primer* dan *reverse primers* yang disusun dari daerah lestari semua gen outer membran protein dan fimbriae A(*accession number* CAA30688; AL627274.1; XO7835.1; AE014613 untuk ompC dan *accession number* AE014613.1 dan AL627267.1 untuk gen penyandi *fimH*. Homologi diantara gen pengkode *ompC* adalah 99% dengan *accession number* AL627274, AE014613.1, M31424.1,FJ009676.1. Homologi gen *fimH* yang berhasil diamplifikasi adalah 94% dengan AE014613.1 dan AL627267.1

Kondisi optimal siklus termal reaksi PCR yaitu denaturasi 95°C selama 1 menit, *annealing* 60°C selama 1 menit, ekstensi 72°C selama 1 menit, dengan siklus reaksi 30 kali. Siklus reaksi diawali dengan denaturasi awal 95°C selama 5 menit dan diakhiri dengan perpanjangan ekstensi selama 10 menit pada 72°C. Tahap denaturasi awal (*hot start*) pada 94°C-96°C selama 5 menit menjamin denaturasi *DNA template* secara lengkap dan *inhibitor* menjadi tidak aktif.

Kontrol kualitas yang dibutuhkan dalam reaksi amplifikasi adalah adanya kontrol positif (DNA *Salmonella ATCC*) dan negatif (*distilled water*) dalam setiap reaksi PCR guna menghindari hasil positif/negatif palsu ataupun kontaminan.

Setelah dilakukan PCR maka dilanjutkan dengan elektroforesis dan didapatkan pita DNA dengan perkiraan panjang nukleotidanya adalah ±1100 pasangan basa (merujuk pada gen pengkode *ompC*) pada sampel nomor 8 dan 9, sedangkan amplifikasi gen *fimH* pada sampel nomor 8 dan 9 yang keluar pita pada posisi ±1000 pasangan basa . Konfirmasi penyebab tidak keluar pita pada proses amplifikasi gen *ompC* dan *fimH* nomor 34,35,37,38 perlu dikaji kestabilan kualitas DNA isolat *Salmonella typhi* gen *ompC* dan *fimH* dengan uji lanjutan guna verifikasi proses amplifikasi. Ketidakberhasilan proses dimungkinkan oleh banyak faktor selain kualitas DNA, yaitu bervariasinya notasi nukleotida dalam susunan primer sehingga penempelan primer pada daerah gen pengkode *ompC* dan *fimH* yang diharapkan dari sampel DNA nomor 34,35,37,38 menjadi kurang sempurna.

Optimasi PCR *primer* dilakukan dengan pengaturan suhu penempelan primer, kadar primer dan penggunaan enzim polymerase (*Taq Polymerase–Roche* dan *High Fidelity Taq Polymerase-Invitrogen*). Kontrol positif DNA yang digunakan adalah DNA *Salmonella typhi ATCC* dan negatif adalah air destilat steril (*distilled water*).

5.5 Pengurutan Nukleotida Hasil Amplifikasi Gen *ompC* dan *fimH S. typhi*

Konfirmasi hasil amplifikasi dibutuhkan guna mengetahui keberhasilan proses amplifikasi terutama kesesuaian penempelan primer dengan sampel DNA uji. Kesalahan penempelan seringkali terjadi terutama ketidakstabilan proses polimerisasi nukleotida secara in vitro. Hasil pengurutan nukleotida yang telah dilakukan pada DNA *ompC* nomor 8 dan 9, DNA *fimH* sampel 8 dan 9 belum sempurna. Pembacaan yang diharapkan adalah sepanjang 1143 pasangan basa untuk gen *ompC* dan 1008 pasaangan basa untuk gen pengkode *fimH*, sehingga akan dilakukan proses pengulangan pembacaan dengan memperbaiki kualitas DNA (tingkat kemurnian maupun konsentrasinya).

5.6 Kloning gen

Produk PCR yang telah dipurifikasi kemudian diinsersikan ke vektor. Vektor yang digunakan yaitu *pHis1525*. Plasmid ini mempunyai ukuran 7474 pb dan tersedia dalam bentuk sirkuler, sehingga proses insersi tidak dapat langsung dilakukan (*direct cloning*) tanpa dipotomng dengan enzim restriksi terlebih dulu. Keuntungan lain penggunaan plasmid *pHis1525* yaitu 1) hasil kloning dapat meng-

gunakan dua inang yang berlainan (*Ecoli DH10β* dan *Bacillus megaterium MS941*; 2) terdapat *T7lac promotor* dapat diinduksi dengan IPTG sehingga dapat mengekspresikan gen yang diinginkan dalam *E.coli DH10β*; 3) penanda *histidine* (*Tag histidine)* yang terdapat pada *C-terminal* berguna untuk deteksi protein rekombinan menggunakan resin *Ni-NTA* atau antibodi *anti-HisG; 4)protease recognition site* yang merupakan sisi pemotongan untuk memisahkan *tag* dari protein rekombinan yang dihasilkan; 5) *lacI gene* yang mengkode *lac repressor* untuk menekan *basal transcription* dari *promotor T7lac* dalam vektor *pHis 1525* dan *promotor lacUV5* yang terdapat dalam kromososm *E.coli DH10β*; 6) *marker* resistensi terhadap ampisilin sebagai seleksi dalam *E.coli DH10β*; 7) mengandung pBR322 *origin* untuk replikasi dan *maintanance* dalam *E.coli* (Studier FW *et al*, 1990).

Vektor *pHis1525* mempunyai *promotor T7lac* yang akan mengekspresikan gen dengan induksi dari IPTG. Menurut Studier FW dan Moffatt BA (1986) menunjukkan bahwa terdapat *basal expression* dari *T7 RNA polymerase* oleh *promotor lacUV5* di dalam λDE3 lysogen tanpa kehadiran *inducer*. Secara umum hal tersebut tidak menjadi masalah tetapi jika gen yang diinginkan toksik terhadap *E.coli* yang digunakan sebagai inang, *basal expression* dari gen yang diinginkan bisa mengganggu stabilitas dari plasmid atau sel mengalami kematian. Vektor *pHis1525* dirancang mengandung *T7lac promotor* untuk mengendalikan ekspresi dari gen yang diinginkan sehingga bisa mengatasi permasalahan tersebut. *T7lac promotor* mengandung sebuah sekuen *lac operator* yang terletak pada *down stream* dari *T7 promotor*. *Lac operator* merupakan *binding site* untuk *lac represor* (*lacI gene*) yang berfungsi untuk menekan *basal transcription* plasmid di dalam *E.coli DH10β*.

Hasil insersi DNA target ke vektor dari sampel jaringan testis normal berupa plasmid rekombinan *pHis1525*. *E.coli* disiapkan untuk menerima plasmid dengan menambahkan $CaCl_2$ sebelum melakukan transfomasi. $CaCl_2$ berfungsi melemahkan dinding sel *E.coli* sehingga akan mempermudah plasmid rekombinan masuk ke dalam *E.coli* pada saat proses *heat shock*. *E.coli* yang telah siap untuk digunakan transformasi disebut sel kompeten.

Persiapan sel kompetan dilakukan dengan menumbuhkan inokulum sel *E.coli DH10β* pada media 500 ml LB cair, kemudian dishaker kurang lebih 2 jam pada suhu 37^0C sehingga didapatkan OD_{600} sekitar 0,4-0,6. Sel inokulum kemudian

direndam es selama 30 menit, lalu disentrifugasi dengan kecepatan 4000rpm. Supernatan dibuang dan pelet yang berisi *E.coli* dicampur dengan $CaCl_2$ steril 100mM dingin sebanyak 50ml. $CaCl_2$ dicampur perlahan dengan pelet *E.coli* kemudian ditaruh dalam es selama 30 menit dan digoyang sesekali. Kemudian dilakukan sentrifugasi dengan kecepatan 3000 rpm dan kemudian pelet dikoleksi. Pelet ditambah $CaCl_2$ 100mM sebanyak 10 ml, diresuspensi dan didiamkan selama 1-2 jam pada es, lalu dialiquot dan disimpan pada -80^{0}C sampai akan digunakan. Sel kompeten *E.coli DH10β* siap digunakan untuk transformasi.

Sel kompeten dicampur dengan plasmid rekombinan secara perlahan kemudian tube dimasukan es serut lagi selama 30 menit agar plasmid rekombinan bercampur dan menyatu dengan sel kompeten. *Heat shock* dilakukan pada *water bath* 42^{0}C selama 45detik untuk membuat kejutan pada sel kompeten sehingga plasmid rekombinan masuk melalui membran sel ke dalam sitoplasma *E.coli*. Tabung yang mengandung plasmid rekombinan segera dimasukan/direndam ke es serut agar pori-pori yang terbentuk di membran *E.coli* segera menutup kembali sehingga plasmid yang sudah tranformasi ke *E.coli* tidak keluar lagi. Kemudian ditambahkan media LB cair yang kaya nutrisi untuk pertumbuhan untuk *E.coli*. Hasil transformasi kemudian dikultur pada media seleksi yaitu media Luria Bertani (LB) agar yang mengandung ampisilin pada inkubator 37^{0}C selama 16-18 jam (Sambrook and Russel, 1991).

Seleksi dilakukan dengan seleksi antibiotika ampisilin. Plasmid didesain mengandung gen resisten ampisilin yaitu gen β lactamase. Protein β lactamase disekresikan ke dalam media kemudian menghidrolisis ampisilin sehingga ampisilin tidak aktif. Sel transforman yang mengandung plasmid rekombinan akan tumbuh subur pada media seleksi yang mengandung ampisilin, sedangkan *E.coli* itu sendiri peka terhadap ampisilin sehingga *E.coli* yang tidak mengandung plasmid rekombinan tidak dapat tumbuh pada media seleksi. Kontrol negatif yang digunakan yaitu *E.coli* yang sama tetapi ditransformasi dengan *destilated water* yang tidak mengandung plasmid rekombinan. Hasil kontrol negatif menunjukkan bahwa *E.coli* tidak tumbuh pada media yang mengandung ampisilin. Hal ini menunjukkan bahwa *E.coli* yang tumbuh pada media LB yang mengandung ampisilin tersebut memang benar *E.coli* yang mengandung plasmid rekombinan.

Apabila sel transforman tumbuh pada media selektif diharapkan proses

kloning berhasil. Sel inang akan memperbanyak diri dengan pembelahan yang diikuti oleh plasmid sehingga didapatkan klon sel transforman dalam jumlah banyak yang mengandung plasmid beserta molekul DNA rekombinan gen *ompC* dan *fimH*.

5.6.1 Restriksi plasmid rekombinan pOmC dan pFimH dengan enzim *Bgl II* dan *NgoMIV*

Restriksi dilakukan dengan menggunakan enzim endonuklease. Enzim endonuklease mampu mendegradasi ikatan fosfodiester antar nukleotida dalam molekul DNA. Terdapat tiga macam enzim endonuklease yaitu tipe I, II dan III. Enzim endonuklease tipe I memotong tidak spesifik, sedangkan endonuklease tipe III mempunyai titik pengenalan yang sangat jauh dengan titik pemotongan. Enzim tipe I dan III lebih komplek dan perannya hanya terbatas pada *genetic engineering* (Brown TA, 2002). Endonuklease tipe II (*restriction endonuclease* tipe II) mempunyai *restriction site* yang spesifik sehingga penting untuk kloning gen. Ciri utama enzim endonuklease tipe II yaitu memotongan ikatan fosfodiester pada urutan DNA yang bersifat palindrom; memotong DNA pada titik pengenalan yang dekat dengan titik pemotongan; pemutusan hidrolitik dua rantai DNA oleh enzim restriksi terjadi pada *restriction site* sehingga dapat menghasilkan *blunt end* atau *sticky end*; enzim ini stabil dan hanya memerlukan magnesium sebagai kofaktor (Primrose and Old RW, 2003).

Analisis restriksi menggunakan enzim *Bgl II dan NgoMIV* yang termasuk enzim endonuklease tipe II. *Bgl II* memotong *restriction site* AGATC secara *sticky end* pada posisi *3'overhang*. *NgoMIV* memotong *restriction site* GCCGGC secara *sticky end* pada posisi *3'overhang*. Dasar pertimbangan pemilihan *Bgl II dan NgoMIV* untuk analisis struktur plasmid rekombinan pada penelitian ini adalah 1) plasmid *pHis1525* mempunyai *restriction site* untuk enzim *Bgl II* dan *NgoMIV* sehingga bisa memotong plasmid rekombinan. 2) gen target tidak miliki *restriction site* terhadap enzim *Bgl II dan NgoMIV* sehingga tidak memotong area koding gen penyandi *ompC* dan *fimH*. Panjang *pHis1525* yaitu 7474 pb, setelah dilakukan insersi area koding gen penyandi *ompC* dan *fimH* yang terdiri dari 1143 dan 1008 pb sehingga total panjang DNA rekombinan pOmpC dan pFimH yaitu 8617 dan 8482 pb.

BAB VI

Kesimpulan dan Saran

6.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian ini dapat disimpulkan bahwa:

1. Seluruh area koding gen *ompC* dan *fimH Salmonella typhi* dapat diisolasi dengan teknik PCR.
2. Seluruh area koding gen *ompC* dan *fimH Salmonella typhi* yang terdapat pada plasmid rekombinan OmpC dan FimH dari penderita demam tifod dapat diakses di *genbank* dengan *accession number* AL627274, AE014613.1, M31424.1,FJ009676.1untuk nukleotida gen *ompC* dan AE014613.1 dan AL627267.1 untuk gen *fimH.*
3. Homologi sekuen gen *ompC* dari penderita demam tifoid adalah 99% dengan *accession number* AL627274, AE014613.1, M31424.1,FJ009676.1. Sekuen seluruh area koding gen *fimH* dari penderita demam tifoid mempunyai homologi 94% dengan sekuen *accession number* AE014613.1 dan AL627267.1.
4. Protein rekombinan OmpC dan FimH yang dikode oleh plasmid rekombinan pOmpC dan pFimH dari penderita demam tifoid dapat diekspresikan dalam *E.coli DH10β* dengan induksi IPTG sehingga dapat menghasilkan protein rekombinan OmpC dan FimH yang dapat digunakan sebagai biomaterial untuk pengembangan diagnosis demam tifoid.

6.2 Saran

Saran yang diajukan yaitu menggunakan protein rekombinan OmpC dan FimH *Salmonella typhi* hasil penelitian ini untuk melakukan penelitian lanjutan dalam mensintesis antibodi anti protein OmpC dan FimH pada hewan coba sehingga dapat digunakan sebagai biomaterial untuk pengembangan diagnosis demam tifoid.

DAFTAR PUSTAKA

Anggraini, 2002. Uji Dot-EIA Tifoid Dengan Antigen OMP Salmonella typhi Jenis Faga Lokal Sebagai Penunjang Diagnosis Demam Tifoid. Tesis Pasca Sarjana Universitas Airlangga, Surabaya.

Baumler AJ, Heffron F, 1995. Identification and Sequnce Analysis of lpf ABCDE, a Putative Fimbrial Operon of *Salmonella typhimurium*. Infect Immun; 177:2087-2097.

Baumler AJ, Tsolis RM, Heffron F, 1996. Contribution of Fimbrial operons to attactmant to and invasion of epithelial cell lines by *Salmonella typhimurium*. Infect Immun; 64:1862-1865.

Bouvet JP and Fischetti VA, 1999. Diversity of Antibody-Mediated Immunity at the Mucosal Barrier. Infect Immun; 67:2687-26-91.

Brumell JH and Finlay BB, 2000. Bacterial Adherence, Colonization, and Invasion of Mucosal Surfaces, in Virulence Mechanisms of Bacterial Pathogens, 3rd ed. ASM Press, Washington DC; 3-17.

Calva E and Puente JL,1995. *Salmonella typhi* Outer Membrane Proteins: Their Roles in Typhoid Fever; SEA J of Tropmed and PH ; 26 Suppl.2:138-144.

Cohen H J, Mechanda SM, Wei Lin, 1996. PCR Amplification of the *fim A* Gene Sequence of *Salmonella typhimurium*, a Specific Method for Detection of *Salmonella* spp. Applied and Environmental Microbiology, Vol 62,No 12, p.4303-4308.

Esinghorst EA, Baron LS, Kopecko DJ,1989. Penetration of human intestinal epithelial cells by *Salmonella* : Molecular Cloning and expression of *Salmonella typhi* invasion determinant in *Escherichia coli*. Proc Natl acad Sci USA; 86:5173-5177.

Gam LH, Devi S, Puthucheary Sd, Koh CL, 1991. Immune reactivity of typhoid sera with OMPs extracted from Salmonella typhi. In T Pang, Koh CL, Puthucheary SD(eds). Typhoid Fever, Strategies for the 90's Kuala Lumpur, World Scientific:207-13.

Handoyo I, 1996. Diagnosis LaboratoriumDemam Tifoid. Jurnal Kimia Klinik Indonesia; 7 (3):117-122.

Harlow and Lane, 1988. Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, USA.

Ismail A, Kader ZSA,Hai OK, 1991. Development of a Dot Enzyme Immunosorbent Assay(EIA) for diagnosis of typhoid fever. In T Pang, Koh CL, Puthucheary SD(eds). Typhoid Fever, Strategies for the 90's Kuala Lumpur, World Scientific:207-6.

Muladno, 2002.Seputar Teknologi Rekayasa Genetika. Bogor: Pusaka Wirausaha Muda.

Salyers AA and Whitt DD, 1994. Bacterial Pathogenesis: a molecular approach.Washington DC: American Society for Microbiology Press : 30-41, 229-241.

Sambrook J, Fritsh EF, Maniatis T, 2001. Molecular Cloning a Laboratory Manual.2nd edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Santoso S, 2002.Protein Adhesin *Salmonella typhi* Sebagai Faktor Virulensi Berpotensi Imunogenik terhadap produksi s-IgA protektif. Disertasi.

Tetsuo Takara et al.,2006.Genetically engineered *Bifidobacterium animalis* expressing the Salmonella flagellin gene for the mucosal immunization in a mouse model. The journal of gene medicine;8:1341-1346.

Zwadyk P, 1992. *Enterobacteriaceae: Salmonella* and *Shigella*, Intestinal Pathogen, in Joklik WK, Willet HP, Amos DB, Wilfert CM, Zinsser Microbiology 20th ed, Appleton & Lange, USA: 556-565.

LAMPIRAN 3.1 Hasil Penjajaraan sekuens gen *ompC* dan *fimH S typhi*

1. Hasil Penjajaran Sekuen Sampel No 9 ompC dengan database nukleotida di *genbank*

```
Sequences producing significant alignments:
```

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
AE014613.1	Salmonella enterica subsp. enterica serovar Typhi Ty2, complete genome	1951	2037	99%	0.0	99%
AL627274.1	Salmonella enterica serovar Typhi (Salmonella typhi) strain CT18, complete chromosome; segment 10/20	1951	1951	99%	0.0	99%
M31424.1	S.typhi outer membrane protein (ompC) gene, complete cds	1951	1951	99%	0.0	99%

```
gb|AE014613.1| Salmonella enterica subsp. enterica serovar Typhi Ty2, complete
genome Length=4791961

 Features in this part of subject sequence:
   outer membrane protein C

 Score = 1951 bits (1056),  Expect = 0.0
 Identities = 1080/1090 (99%), Gaps = 8/1090 (0%)
 Strand=Plus/Plus

Query  7       TGGTA-CAGCTCTGCTGGTGGCGGGCGCAGCGAATGCGGCTGAAATTTATAATAAAGACG  65
               ||||| ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  681208  TGGTACCAGCTCTGCTGGTGGCGGGCGCAGCGAATGCGGCTGAAATTTATAATAAAGACG  681267

Query  66      GCAACAAATTAGACCTGTTTGGTAAAGTTGATGGCCTGCACTACTTCTCTGACGACAAAG  125
               ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  681268  GCAACAAATTAGACCTGTTTGGTAAAGTTGATGGCCTGCACTACTTCTCTGACGACAAAG  681327

Query  126     GCAGCGACGGCGACCAGACCTACATGCGTATCGGCTTCAAAGGCGAAACGCAGGTTAACG  185
               ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  681328  GCAGCGACGGCGACCAGACCTACATGCGTATCGGCTTCAAAGGCGAAACGCAGGTTAACG  681387

Query  186     ATCAGCTGACCGGTTATGGCCAGTGGGAATATCAGATTCAGGGCAACCAGACTGAAGGCA  245
               ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  681388  ATCAGCTGACCGGTTATGGCCAGTGGGAATATCAGATTCAGGGCAACCAGACTGAAGGCA  681447

Query  246     GCAACGACTCCTGGACGCGTGTGGCGTTTGCGGGTCTGAAATTCGCTGACGCAGGTTCCT  305
               ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  681448  GCAACGACTCCTGGACGCGTGTGGCGTTTGCGGGTCTGAAATTCGCTGACGCAGGTTCCT  681507

Query  306     TCGATTATGGTCGTAAACTACGGCGTAACCTATGACGTGACCTCCTGGACCGACGTTCTG  365
               |||||||||||||| |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  681508  TCGATTATGGTCGT-AACTACGGCGTAACCTATGACGTGACCTCCTGGACCGACGTTCTG  681566
```

```
Query  366     CCGGAGTTCGGCGGCGACACCTACGGCGCTGACAACTTTATGCAGCAGCGTGGTAACGGG  425
               |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  681567  CCGGAGTTCGGCGGCGACACCTACGGCGCTGACAACTTTATGCAGCAGCGTGGTAACGG-  681625

Query  426     CTATGCTACCTACCGTAACACCGACTTCTTCGGTCTGGTGGATGGTCTGGACTTCGCGTT  485
               ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  681626  CTATGCTACCTACCGTAACACCGACTTCTTCGGTCTGGTGGATGGTCTGGACTTCGCGTT  681685

Query  486     GCAGTATCAGGGCAAAAACGGCAGCGTGAGCGGTGAAAACACCAACGGTCGCAGCCTGCT  545
               ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  681686  GCAGTATCAGGGCAAAAACGGCAGCGTGAGCGGTGAAAACACCAACGGTCGCAGCCTGCT  681745

Query  546     GAACCAGAACGGCGACGGTTACGGCGGATCGCTGACTTATGCAATCGGCGAAGGCTTCTC  605
               ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  681746  GAACCAGAACGGCGACGGTTACGGCGGATCGCTGACTTATGCAATCGGCGAAGGCTTCTC  681805

Query  606     CGTCGGTGGCGCTATCACCACGTCTAAACGTACTGCCGATCAGAACAACACCGCTAACGC  665
                |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  681806  TGTCGGTGGCGCTATCACCACGTCTAAACGTACTGCCGATCAGAACAACACCGCTAACGC  681865

Query  666     TCGCCTGTATGGTAACGGCGATCGCGCCACGGTTTACACCGGCGGCCTGAAATACGATGC  725
               ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  681866  TCGCCTGTATGGTAACGGCGATCGCGCCACGGTTTACACCGGCGGCCTGAAATACGATGC  681925

Query  726     GAACAACATCTATCTGGCAGCGCAGTATTCTC-GAACCTATAACGCAACCCGTTTTGGTA  784
               |||||||||||||||||||||||||||||||| || ||||||||||||||||||||||||
Sbjct  681926  GAACAACATCTATCTGGCAGCGCAGTATTCTCAGA-CCTATAACGCAACCCGTTTTGGTA  681984

Query  785     CCTTCTA-CGGCAGCAACCCGTCCACTTCTTACGGTTTTGCCAACAAAGCGCAGAACTTT  843
               ||| ||| |||||||||||||||||| |||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  681985  CCT-CTAACGGCAGCAACCCGTCCACCTCTTACGGTTTTGCCAACAAAGCGCAGAACTTT  682043

Query  844     GAAGTGGTTGCTCAGTACCAGTTCGACTTTGGTCTGCGTCCGTCTGTGGCTTACCTGCAG  903
               ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  682044  GAAGTGGTTGCTCAGTACCAGTTCGACTTTGGTCTGCGTCCGTCTGTGGCTTACCTGCAG  682103

Query  904     TCTAAAGGTAAGGACATCAGCAACGGCTACGGCGCCAGCTATGGCGACCAGGACATCGTA  963
               ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  682104  TCTAAAGGTAAGGACATCAGCAACGGCTACGGCGCCAGCTATGGCGACCAGGACATCGTA  682163

Query  964     AAATACGTTGATGTCGGCGCGACTTACTACTTCAACAAAAACATGTCCACCTATGTTGAT  1023
               ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  682164  AAATACGTTGATGTCGGCGCGACTTACTACTTCAACAAAAACATGTCCACCTATGTTGAT  682223

Query  1024    TACAAAATCAACCTGCTGGATAAAAACGACTT-ACCCGCGATGCGGGCATCAACACCGAC  1082
               |||||||||||||||||||||||||||||||| |||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  682224  TACAAAATCAACCTGCTGGATAAAAACGACTTTACCCGCGATGCGGGCATCAACACCGAC  682283

Query  1083    GACATCGTAG  1092
               ||||||||||
Sbjct  682284  GACATCGTAG  682293
```

Features in this part of subject sequence:
outer membrane protein F precursor

```
 Score = 86.1 bits (46),  Expect = 4e-13
 Identities = 175/234 (74%), Gaps = 22/234 (9%)
 Strand=Plus/Plus

Query  826      AACAAAGCGCAGAACTTTGAAGTGGTTGCTCAGTACCAGTTCGACTTTGGTCTGCGTCCG  885
                |||||| |||||||| | |||||||| |||||||||||||| ||||| || |||||||||
Sbjct  1980501  AACAAAACGCAGAACCTGGAAGTGGTCGCTCAGTACCAGTTTGACTTCGGCCTGCGTCCG  1980560

Query  886      TCTGTGGCTTACCTGCAGTCTAAAGGTAAGGACA-TCAGCAACGGCTACGGCGCCAGCTA  944
                 |  |  | ||  |||||  ||||||||| | || |  | |||||   || || | ||| 
Sbjct  1980561  GCAATCTCGTATGTGCAGAGTAAAGGTAA-G-CAGT-TG-AACGG---CGCCGACGGCT-  1980612

Query  945      TGG-CGACCAGGACATCGTAAAATACGTTGATGTC-GGCGCGACTTACTACTTCAACAAA  1002
                 || ||| | ||    ||  |||||  || | | | ||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1980613  CGGCCGATCTGG----CG--AAATATATTCA-GGCGGGCGCGACTTACTACTTCAACAAA  1980665

Query  1003     AACATGTCCACCTATG--TTGATTACAAAATCAACCTGCTGGATAAAAACGACT  1054
                ||||||   || ||||  |||| |||    |||||||||||||  |||||||||
Sbjct  1980666  AACATGA--ACGTATGGGTTGACTACCGTTTCAACCTGCTGGACGAAAACGACT  1980717
```

> emb|AL627274.1| Salmonella enterica serovar Typhi (Salmonella typhi) strain CT
complete chromosome; segment 10/20
Length=256050

Features in this part of subject sequence:
outer membrane protein C

```
 Score = 1951 bits (1056),  Expect = 0.0
 Identities = 1080/1090 (99%), Gaps = 8/1090 (0%)
 Strand=Plus/Minus

Query  7        TGGTA-CAGCTCTGCTGGTGGCGGGCGCAGCGAATGCGGCTGAAATTTATAATAAAGACG  65
                ||||| ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  22505    TGGTACCAGCTCTGCTGGTGGCGGGCGCAGCGAATGCGGCTGAAATTTATAATAAAGACG  22446

Query  66       GCAACAAATTAGACCTGTTTGGTAAAGTTGATGGCCTGCACTACTTCTCTGACGACAAAG  125
                ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  22445    GCAACAAATTAGACCTGTTTGGTAAAGTTGATGGCCTGCACTACTTCTCTGACGACAAAG  22386

Query  126      GCAGCGACGGCGACCAGACCTACATGCGTATCGGCTTCAAAGGCGAAACGCAGGTTAACG  185
                ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  22385    GCAGCGACGGCGACCAGACCTACATGCGTATCGGCTTCAAAGGCGAAACGCAGGTTAACG  22326

Query  186      ATCAGCTGACCGGTTATGGCCAGTGGGAATATCAGATTCAGGGCAACCAGACTGAAGGCA  245
                ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  22325    ATCAGCTGACCGGTTATGGCCAGTGGGAATATCAGATTCAGGGCAACCAGACTGAAGGCA  22266

Query  246      GCAACGACTCCTGGACGCGTGTGGCGTTTGCGGGTCTGAAATTCGCTGACGCAGGTTCCT  305
                ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  22265    GCAACGACTCCTGGACGCGTGTGGCGTTTGCGGGTCTGAAATTCGCTGACGCAGGTTCCT  22206
```

```
Query  306    TCGATTATGGTCGTAAACTACGGCGTAACCTATGACGTGACCTCCTGGACCGACGTTCTG  365
              |||||||||||||| |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  22205  TCGATTATGGTCGT-AACTACGGCGTAACCTATGACGTGACCTCCTGGACCGACGTTCTG  22147

Query  366    CCGGAGTTCGGCGGCGACACCTACGGCGCTGACAACTTTATGCAGCAGCGTGGTAACGGG  425
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||| ||
Sbjct  22146  CCGGAGTTCGGCGGCGACACCTACGGCGCTGACAACTTTATGCAGCAGCGTGGTAAC-GG  22088

Query  426    CTATGCTACCTACCGTAACACCGACTTCTTCGGTCTGGTGGATGGTCTGGACTTCGCGTT  485
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  22087  CTATGCTACCTACCGTAACACCGACTTCTTCGGTCTGGTGGATGGTCTGGACTTCGCGTT  22028

Query  486    GCAGTATCAGGGCAAAAACGGCAGCGTGAGCGGTGAAAACACCAACGGTCGCAGCCTGCT  545
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  22027  GCAGTATCAGGGCAAAAACGGCAGCGTGAGCGGTGAAAACACCAACGGTCGCAGCCTGCT  21968

Query  546    GAACCAGAACGGCGACGGTTACGGCGGATCGCTGACTTATGCAATCGGCGAAGGCTTCTC  605
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  21967  GAACCAGAACGGCGACGGTTACGGCGGATCGCTGACTTATGCAATCGGCGAAGGCTTCTC  21908

Query  606    CGTCGGTGGCGCTATCACCACGTCTAAACGTACTGCCGATCAGAACAACACCGCTAACGC  665
               |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  21907  TGTCGGTGGCGCTATCACCACGTCTAAACGTACTGCCGATCAGAACAACACCGCTAACGC  21848

Query  666    TCGCCTGTATGGTAACGGCGATCGCGCCACGGTTTACACCGGCGGCCTGAAATACGATGC  725
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  21847  TCGCCTGTATGGTAACGGCGATCGCGCCACGGTTTACACCGGCGGCCTGAAATACGATGC  21788

Query  726    GAACAACATCTATCTGGCAGCGCAGTATTCTCGA-ACCTATAACGCAACCCGTTTTGGTA  784
              |||||||||||||||||||||||||||||||| | |||||||||||||||||||||||||
Sbjct  21787  GAACAACATCTATCTGGCAGCGCAGTATTCTC-AGACCTATAACGCAACCCGTTTTGGTA  21729

Query  785    CCTTCT-ACGGCAGCAACCCGTCCACTTCTTACGGTTTTGCCAACAAAGCGCAGAACTTT  843
              || ||| ||||||||||||||||||| |||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  21728  CC-TCTAACGGCAGCAACCCGTCCACCTCTTACGGTTTTGCCAACAAAGCGCAGAACTTT  21670

Query  844    GAAGTGGTTGCTCAGTACCAGTTCGACTTTGGTCTGCGTCCGTCTGTGGCTTACCTGCAG  903
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  21669  GAAGTGGTTGCTCAGTACCAGTTCGACTTTGGTCTGCGTCCGTCTGTGGCTTACCTGCAG  21610

Query  904    TCTAAAGGTAAGGACATCAGCAACGGCTACGGCGCCAGCTATGGCGACCAGGACATCGTA  963
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  21609  TCTAAAGGTAAGGACATCAGCAACGGCTACGGCGCCAGCTATGGCGACCAGGACATCGTA  21550

Query  964    AAATACGTTGATGTCGGCGCGACTTACTACTTCAACAAAAACATGTCCACCTATGTTGAT  1023
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  21549  AAATACGTTGATGTCGGCGCGACTTACTACTTCAACAAAAACATGTCCACCTATGTTGAT  21490

Query  1024   TACAAAATCAACCTGCTGGATAAAAACGACTT-ACCCGCGATGCGGGCATCAACACCGAC  1082
              |||||||||||||||||||||||||||||||| |||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  21489  TACAAAATCAACCTGCTGGATAAAAACGACTTTACCCGCGATGCGGGCATCAACACCGAC  21430

Query  1083   GACATCGTAG  1092
              ||||||||||
Sbjct  21429  GACATCGTAG  21420
```

```
>  gb|M31424.1|STYOMPC  S.typhi outer membrane protein (ompC) gene, complete cds
Length=1639

 Score = 1951 bits (1056),  Expect = 0.0
 Identities = 1080/1090 (99%), Gaps = 8/1090 (0%)
 Strand=Plus/Plus

Query  7     TGGTA-CAGCTCTGCTGGTGGCGGGCGCAGCGAATGCGGCTGAAATTTATAATAAAGACG  65
             ||||| ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  429   TGGTACCAGCTCTGCTGGTGGCGGGCGCAGCGAATGCGGCTGAAATTTATAATAAAGACG  488

Query  66    GCAACAAATTAGACCTGTTTGGTAAAGTTGATGGCCTGCACTACTTCTCTGACGACAAAG  125
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  489   GCAACAAATTAGACCTGTTTGGTAAAGTTGATGGCCTGCACTACTTCTCTGACGACAAAG  548

Query  126   GCAGCGACGGCGACCAGACCTACATGCGTATCGGCTTCAAAGGCGAAACGCAGGTTAACG  185
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  549   GCAGCGACGGCGACCAGACCTACATGCGTATCGGCTTCAAAGGCGAAACGCAGGTTAACG  608

Query  186   ATCAGCTGACCGGTTATGGCCAGTGGGAATATCAGATTCAGGGCAACCAGACTGAAGGCA  245
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  609   ATCAGCTGACCGGTTATGGCCAGTGGGAATATCAGATTCAGGGCAACCAGACTGAAGGCA  668

Query  246   GCAACGACTCCTGGACGCGTGTGGCGTTTGCGGGTCTGAAATTCGCTGACGCAGGTTCCT  305
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  669   GCAACGACTCCTGGACGCGTGTGGCGTTTGCGGGTCTGAAATTCGCTGACGCAGGTTCCT  728

Query  306   TCGATTATGGTCGTAAACTACGGCGTAACCTATGACGTGACCTCCTGGACCGACGTTCTG  365
             |||||||||||||| |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  729   TCGATTATGGTCGT-AACTACGGCGTAACCTATGACGTGACCTCCTGGACCGACGTTCTG  787

Query  366   CCGGAGTTCGGCGGCGACACCTACGGCGCTGACAACTTTATGCAGCAGCGTGGTAACGGG  425
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||| 
Sbjct  788   CCGGAGTTCGGCGGCGACACCTACGGCGCTGACAACTTTATGCAGCAGCGTGGTAACGG-  846

Query  426   CTATGCTACCTACCGTAACACCGACTTCTTCGGTCTGGTGGATGGTCTGGACTTCGCGTT  485
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  847   CTATGCTACCTACCGTAACACCGACTTCTTCGGTCTGGTGGATGGTCTGGACTTCGCGTT  906

Query  486   GCAGTATCAGGGCAAAAACGGCAGCGTGAGCGGTGAAAACACCAACGGTCGCAGCCTGCT  545
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  907   GCAGTATCAGGGCAAAAACGGCAGCGTGAGCGGTGAAAACACCAACGGTCGCAGCCTGCT  966

Query  546   GAACCAGAACGGCGACGGTTACGGCGGATCGCTGACTTATGCAATCGGCGAAGGCTTCTC  605
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  967   GAACCAGAACGGCGACGGTTACGGCGGATCGCTGACTTATGCAATCGGCGAAGGCTTCTC  1026

Query  606   CGTCGGTGGCGCTATCACCACGTCTAAACGTACTGCCGATCAGAACAACACCGCTAACGC  665
              |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1027  TGTCGGTGGCGCTATCACCACGTCTAAACGTACTGCCGATCAGAACAACACCGCTAACGC  1086

Query  666   TCGCCTGTATGGTAACGGCGATCGCGCCACGGTTTACACCGGCGGCCTGAAATACGATGC  725
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1087  TCGCCTGTATGGTAACGGCGATCGCGCCACGGTTTACACCGGCGGCCTGAAATACGATGC  1146
```

```
Query  726   GAACAACATCTATCTGGCAGCGCAGTATTCTC-GAACCTATAACGCAACCCGTTTTGGTA  784
             |||||||||||||||||||||||||||||||| || ||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1147  GAACAACATCTATCTGGCAGCGCAGTATTCTCAGA-CCTATAACGCAACCCGTTTTGGTA  1205

Query  785   CCTTCTA-CGGCAGCAACCCGTCCACTTCTTACGGTTTTGCCAACAAAGCGCAGAACTTT  843
             ||| ||| |||||||||||||||||| |||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1206  CCT-CTAACGGCAGCAACCCGTCCACCTCTTACGGTTTTGCCAACAAAGCGCAGAACTTT  1264

Query  844   GAAGTGGTTGCTCAGTACCAGTTCGACTTTGGTCTGCGTCCGTCTGTGGCTTACCTGCAG  903
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1265  GAAGTGGTTGCTCAGTACCAGTTCGACTTTGGTCTGCGTCCGTCTGTGGCTTACCTGCAG  1324

Query  904   TCTAAAGGTAAGGACATCAGCAACGGCTACGGCGCCAGCTATGGCGACCAGGACATCGTA  963
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1325  TCTAAAGGTAAGGACATCAGCAACGGCTACGGCGCCAGCTATGGCGACCAGGACATCGTA  1384

Query  964   AAATACGTTGATGTCGGCGCGACTTACTACTTCAACAAAAACATGTCCACCTATGTTGAT  1023
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1385  AAATACGTTGATGTCGGCGCGACTTACTACTTCAACAAAAACATGTCCACCTATGTTGAT  1444

Query  1024  TACAAAATCAACCTGCTGGATAAAAACGACTT-ACCCGCGATGCGGGCATCAACACCGAC  1082
             |||||||||||||||||||||||||||||||| |||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1445  TACAAAATCAACCTGCTGGATAAAAACGACTTTACCCGCGATGCGGGCATCAACACCGAC  1504

Query  1083  GACATCGTAG  1092
             ||||||||||
Sbjct  1505  GACATCGTAG  1514
```

>gb|FJ009676.1| Salmonella typhi strain SKST outer membrane protein (ompC) gene, partial cds
Length=1131

```
 Score = 1945 bits (1053),  Expect = 0.0
 Identities = 1079/1090 (98%), Gaps = 8/1090 (0%)
 Strand=Plus/Plus

Query  7    TGGTA-CAGCTCTGCTGGTGGCGGGCGCAGCGAATGCGGCTGAAATTTATAATAAAGACG  65
            ||||| ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  20   TGGTACCAGCTCTGCTGGTGGCGGGCGCAGCGAATGCGGCTGAAATTTATAATAAAGACG  79

Query  66   GCAACAAATTAGACCTGTTTGGTAAAGTTGATGGCCTGCACTACTTCTCTGACGACAAAG  125
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  80   GCAACAAATTAGACCTGTTTGGTAAAGTTGATGGCCTGCACTACTTCTCTGACGACAAAG  139

Query  126  GCAGCGACGGCGACCAGACCTACATGCGTATCGGCTTCAAAGGCGAAACGCAGGTTAACG  185
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  140  GCAGCGACGGCGACCAGACCTACATGCGTATCGGCTTCAAAGGCGAAACGCAGGTTAACG  199

Query  186  ATCAGCTGACCGGTTATGGCCAGTGGGAATATCAGATTCAGGGCAACCAGACTGAAGGCA  245
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  200  ATCAGCTGACCGGTTATGGCCAGTGGGAATATCAGATTCAGGGCAACCAGACTGAAGGCA  259

Query  246  GCAACGACTCCTGGACGCGTGTGGCGTTTGCGGGTCTGAAATTCGCTGACGCAGGTTCCT  305
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  260  GCAACGACTCCTGGACGCGTGTGGCGTTTGCGGGTCTGAAATTCGCTGACGCAGGTTCCT  319
```

```
Query  306   TCGATTATGGTCGTAAACTACGGCGTAACCTATGACGTGACCTCCTGGACCGACGTTCTG  365
             |||||||||||||| |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  320   TCGATTATGGTCGT-AACTACGGCGTAACCTATGACGTGACCTCCTGGACCGACGTTCTG  378

Query  366   CCGGAGTTCGGCGGCGACACCTACGGCGCTGACAACTTTATGCAGCAGCGTGGTAACGGG  425
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||| 
Sbjct  379   CCGGAGTTCGGCGGCGACACCTACGGCGCTGACAACTTTATGCAGCAGCGTGGTAACGG-  437

Query  426   CTATGCTACCTACCGTAACACCGACTTCTTCGGTCTGGTGGATGGTCTGGACTTCGCGTT  485
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  438   CTATGCTACCTACCGTAACACCGACTTCTTCGGTCTGGTGGATGGTCTGGACTTCGCGTT  497

Query  486   GCAGTATCAGGGCAAAAACGGCAGCGTGAGCGGTGAAAACACCAACGGTCGCAGCCTGCT  545
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  498   GCAGTATCAGGGCAAAAACGGCAGCGTGAGCGGTGAAAACACCAACGGTCGCAGCCTGCT  557

Query  546   GAACCAGAACGGCGACGGTTACGGCGGATCGCTGACTTATGCAATCGGCGAAGGCTTCTC  605
             |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||| |||
Sbjct  558   GAACCAGAACGGCGACGGTTACGGCGGATCGCTGACTTATGCAATCGGCGAAGGCTACTC  617

Query  606   CGTCGGTGGCGCTATCACCACGTCTAAACGTACTGCCGATCAGAACAACACCGCTAACGC  665
              |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  618   TGTCGGTGGCGCTATCACCACGTCTAAACGTACTGCCGATCAGAACAACACCGCTAACGC  677

Query  666   TCGCCTGTATGGTAACGGCGATCGCGCCACGGTTTACACCGGCGGCCTGAAATACGATGC  725
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  678   TCGCCTGTATGGTAACGGCGATCGCGCCACGGTTTACACCGGCGGCCTGAAATACGATGC  737

Query  726   GAACAACATCTATCTGGCAGCGCAGTATTCTC-GAACCTATAACGCAACCCGTTTTGGTA  784
             |||||||||||||||||||||||||||||||| || ||||||||||||||||||||||||
Sbjct  738   GAACAACATCTATCTGGCAGCGCAGTATTCTCAGA-CCTATAACGCAACCCGTTTTGGTA  796

Query  785   CCTTCTA-CGGCAGCAACCCGTCCACTTCTTACGGTTTTGCCAACAAAGCGCAGAACTTT  843
             ||| ||| |||||||||||||||||| |||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  797   CCT-CTAACGGCAGCAACCCGTCCACCTCTTACGGTTTTGCCAACAAAGCGCAGAACTTT  855

Query  844   GAAGTGGTTGCTCAGTACCAGTTCGACTTTGGTCTGCGTCCGTCTGTGGCTTACCTGCAG  903
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  856   GAAGTGGTTGCTCAGTACCAGTTCGACTTTGGTCTGCGTCCGTCTGTGGCTTACCTGCAG  915

Query  904   TCTAAAGGTAAGGACATCAGCAACGGCTACGGCGCCAGCTATGGCGACCAGGACATCGTA  963
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  916   TCTAAAGGTAAGGACATCAGCAACGGCTACGGCGCCAGCTATGGCGACCAGGACATCGTA  975

Query  964   AAATACGTTGATGTCGGCGCGACTTACTACTTCAACAAAAACATGTCCACCTATGTTGAT  1023
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  976   AAATACGTTGATGTCGGCGCGACTTACTACTTCAACAAAAACATGTCCACCTATGTTGAT  1035

Query  1024  TACAAAATCAACCTGCTGGATAAAAACGACTT-ACCCGCGATGCGGGCATCAACACCGAC  1082
             |||||||||||||||||||||||||||||||| |||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1036  TACAAAATCAACCTGCTGGATAAAAACGACTTTACCCGCGATGCGGGCATCAACACCGAC  1095

Query  1083  GACATCGTAG  1092
             ||||||||||
Sbjct  1096  GACATCGTAG  1105
```

2. Hasil Penjajaran Sekuen Sampel No 9 *fimH* dengan database nukleotida di *genbank*

Sequences producing significant alignments:

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
AE014613.1	Salmonella enterica subsp. enterica serovar Typhi Ty2, complete genome	1404	1404	96%	0.0	94%
AL627267.1	Salmonella enterica serovar Typhi (Salmonella typhi) strain CT18, complete chromosome; segment 3/20	1399	1399	96%	0.0	94%

```
> gb|AE014613.1| Salmonella enterica subsp. enterica serovar Typhi Ty2,
complete genome
Length=4791961

 Features in this part of subject sequence:
   FimH protein precursor

 Score = 1404 bits (760),  Expect = 0.0
 Identities = 865/913 (94%), Gaps = 18/913 (1%)
 Strand=Plus/Minus
Query  14       TCCCGTGCAGGCGACGG-ACGTCGTAATTGGGGCGGGACGGCGACCGATATCTTTATGA  72
                ||||| || ||||||||   | |||||||     ||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  2380415  TCCCGCGCTGGCGACGGTTTGCCGTAATTCAAACGGGACGGCGACCGATATCTTTATGA  2380356

Query  73       CCTGTCAGATGTTTTCACCAGCGGCAATAATCAGCCGGGACAGGTGGTGACGCTGCTGAA  132
                ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  2380355  CCTGTCAGATGTTTTCACCAGCGGCAATAATCAGCCGGGACAGGTGGTGACGCTGCTGAA  2380296

Query  133      AAAATCAGATTGGTGCGGCGTAAACGCGACGTGCCCGGCGGGGACAACGGTGAATTATCC  192
                |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||| |
Sbjct  2380295  AAAATCAGATTGGTGCGGCGTAAACGCGACGTGCCCGGCGGGGACAACGGTGAATTATAC  2380236

Query  193      CTACCGAAGCTATGTATCAGAATTACCGGTACAAAGCACCGAAAGAAATTTTAAATACCT  252
                ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||| ||||||||||||||||
Sbjct  2380235  CTACCGAAGCTATGTATCAGAATTACCGGTACAAAGCACCGAAGGAAATTTTAAATACCT  2380176

Query  253      CAAGTTGAATGACTACCTTCTGGGCGCGATGAGCATAACCGATAGTGTCGCTGGCGTATT  312
                ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  2380175  CAAGTTGAATGACTACCTTCTGGGCGCGATGAGCATAACCGATAGTGTCGCTGGCGTATT  2380116

Query  313      TTATCCGCCCCGTAACTATATTCGCATGGGCGTCGACTCTAACGTGTCGCAGCAAAAGCC  372
                ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  2380115  TTATCCGCCCCGTAACTATATTCGCATGGGCGTCGACTCTAACGTGTCGCAGCAAAAGCC  2380056


Query  373      GTTTGGCGTGCAGGACTCAAAGCTGGTTTTTAAATTAAAAGTGATACGGCCTTTTATTAA  432
```

```
                  ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  2380055    GTTTGGCGTGCAGGACTCAAAGCTGGTTTTAAATTAAAAGTGATACGGCCTTTTATTAA  2379996

Query  433        TATAGTGACGATCCCCCGCCAGACAATGTTTACCGTCTATGTGACGACCTCTACCGGCGA  492
                  ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  2379995    TATAGTGACGATCCCCCGCCAGACAATGTTTACCGTCTATGTGACGACCTCTACCGGCGA  2379936

Query  493        CGCGTTGAGCACGCCGGTGTATACCATTAGCTACAGCGGCAAAGTGGAAGTACCGCAAAA  552
                  ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  2379935    CGCGTTGAGCACGCCGGTGTATACCATTAGCTACAGCGGCAAAGTGGAAGTACCGCAAAA  2379876

Query  553        ACTGTGAAGTGAATGCCGGACAGGTCGTGGAGTTTGATTTTCGGCGATATCGGGCGCGCC  612
                   ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||| |||||||||||| ||||||
Sbjct  2379875    -CTGTGAAGTGAATGCCGGACAGGTCGTGGAGTTTGATTT-CGGCGATATCGG-CGCGCC  2379819

Query  613        GTTATTTTAGTCAGGCGGGAGCGGGTAATCGTCCGCAAGGCGTCACGCCGCAAGCGAAAA  672
                  ||||||| ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  2379818    GTTATTT-AGTCAGGCGGGAGCGGGTAATCGTCCGCAAGGCGTCACGCCGCAAGCGAAAA  2379760

Query  673        CTATCGCTATCAAATGT-CCAACCTCCGCGGCGCAAGCTTATTTATCGATGCGGCTTTGA  731
                  ||||||||||||||||| ||||| || ||||||||||| |||||||||||||||||| ||
Sbjct  2379759    CTATCGCTATCAAATGTACCAACGTC-GCGGCGCAAGCCTATTTATCGATGCGGCTT-GA  2379702

Query  732        ATCCTAAAAGGCCTCAAGGCAAGGCAATGGTGTCTGATAACCGGGTATT-AGGCTCTGGG  790
                  | || ||||||||||| |||| ||| |||||||| ||||||| || ||| ||||| || |
Sbjct  2379701    AGCCGAAAAGGCCTCAGGGCA-GGCGATGGTGTCCGATAACCCGG-ATTTAGGCTTTGTG  2379644

Query  791        GTATG-TAATAAGCA-CAG-ACGCCGGCTCATACCCAATAATTTGTCGAGTAAAATTCCG  847
                  || || ||||| ||| | | |||||| |||| ||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  2379643    GT-TGCTAATA-GCAACGGTACGCCG-CTCACACCCAATAATTTGTCGAGTAAAATTCCG  2379587

Query  848        TTTCATCTTGATGATAACGCCGCCGCTCGCGTAGGTATTCGTTCCCGTCCGATCAGCATG  907
                  |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||  || | ||||||||| ||
Sbjct  2379586    TTTCATCTTGATGATAACGCCGCCGCTCGCGTAGGTATTCGCGCCTGGCCGATCAGCGTG  2379527

Query  908        CCAGGGAA-AAAC  919
                   | ||||| ||||
Sbjct  2379526    ACGGGGAATAAAC  2379514
```

> emb|AL627267.1| Salmonella enterica serovar Typhi (Salmonella typhi) strain CT18, complete chromosome; segment 3/20
Length=240050
Features in this part of subject sequence:
FimH protein precursor
Score = 1399 bits (757), Expect = 0.0
Identities = 864/913 (94%), Gaps = 18/913 (1%) Strand=Plus/Plus

```
Query  14      TCCCGTGCAGGCGACGG-ACGTCGTAATTGGGGCGGACGGCGACCGATATCTTTTATGA  72
               ||||| || ||||||||   | |||||||    ||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  81686   TCCCGCGCTGGCGACGGTTTGCCGTAATTCAAACGGACGGCGACCGATATCTTTTATGA  81745

Query  73      CCTGTCAGATGTTTTCACCAGCGGCAATAATCAGCCGGGACAGGTGGTGACGCTGCTGAA  132
               ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  81746   CCTGTCAGATGTTTTCACCAGCGGCAATAATCAGCCGGGACAGGTGGTGACGCTGCTGAA  81805
```

```
Query  133    AAAATCAGATTGGTGCGGCGTAAACGCGACGTGCCCGGCGGGGACAACGGTGAATTATCC  192
              |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||| |
Sbjct  81806  AAAATCAGATTGGTGCGGCGTAAACGCGACGTGCCCGGCGGGGACAACGGTGAATTATAC  81865

Query  193    CTACCGAAGCTATGTATCAGAATTACCGGTACAAAGCACCGAAAGAAATTTTAAATACCT  252
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||| ||||||||||||||||
Sbjct  81866  CTACCGAAGCTATGTATCAGAATTACCGGTACAAAGCACCGAAGGAAATTTTAAATACCT  81925

Query  253    CAAGTTGAATGACTACCTTCTGGGCGCGATGAGCATAACCGATAGTGTCGCTGGCGTATT  312
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  81926  CAAGTTGAATGACTACCTTCTGGGCGCGATGAGCATAACCGATAGTGTCGCTGGCGTATT  81985

Query  313    TTATCCGCCCCGTAACTATATTCGCATGGGCGTCGACTCTAACGTGTCGCAGCAAAAGCC  372
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  81986  TTATCCGCCCCGTAACTATATTCGCATGGGCGTCGACTCTAACGTGTCGCAGCAAAAGCC  82045

Query  373    GTTTGGCGTGCAGGACTCAAAGCTGGTTTTTAAATTAAAAGTGATACGGCCTTTTATTAA  432
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  82046  GTTTGGCGTGCAGGACTCAAAGCTGGTTTTTAAATTAAAAGTGATACGGCCTTTTATTAA  82105

Query  433    TATAGTGACGATCCCCCGCCAGACAATGTTTACCGTCTATGTGACGACCTCTACCGGCGA  492
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  82106  TATAGTGACGATCCCCCGCCAGACAATGTTTACCGTCTATGTGACGACCTCTACCGGCGA  82165

Query  493    CGCGTTGAGCACGCCGGTGTATACCATTAGCTACAGCGGCAAAGTGGAAGTACCGCAAAA  552
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  82166  CGCGTTGAGCACGCCGGTGTATACCATTAGCTACAGCGGCAAAGTGGAAGTACCGCAAAA  82225

Query  553    ACTGTGAAGTGAATGCCGGACAGGTCGTGGAGTTTGATTTTCGGCGATATCGGGCGCGCC  612
               ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||| |||||||||||| ||||||
Sbjct  82226  -CTGTGAAGTGAATGCCGGACAGGTCGTGGAGTTTGATTT-CGGCGATATCGG-CGCGCC  82282

Query  613    GTTATTTTAGTCAGGCGGGAGCGGGTAATCGTCCGCAAGGCGTCACGCCGCAAGCGAAAA  672
              ||||||| ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  82283  GTTATTT-AGTCAGGCGGGAGCGGGTAATCGTCCGCAAGGCGTCACGCCGCAAGCGAAAA  82341

Query  673    CTATCGCTATCAAATGT-CCAACCTCCGCGGCGCAAGCTTATTTATCGATGCGGCTTTGA  731
              ||||||||||||||||| ||||| || ||||||||||| |||||||||||||||||| ||
Sbjct  82342  CTATCGCTATCAAATGTACCAACGTC-GCGGCGCAAGCCTATTTATCGATGCGGCTT-GA  82399

Query  732    ATCCTAAAAGGCCTCAAGGCAAGGCAATGGTGTCTGATAACCGGGTATT-AGGCTCTGGG  790
              | || |||| |||||| |||| ||| |||||||| ||||||| || ||| ||||| || |
Sbjct  82400  AGCCGAAAAAGCCTCAGGGCA-GGCGATGGTGTCCGATAACCCGG-ATTTAGGCTTTGTG  82457

Query  791    GTATG-TAATAAGCA-CAG-ACGCCGGCTCATACCCAATAATTTGTCGAGTAAAATTCCG  847
              || || ||||| ||| | | |||||| |||| ||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  82458  GT-TGCTAATA-GCAACGGTACGCCG-CTCACACCCAATAATTTGTCGAGTAAAATTCCG  82514

Query  848    TTTCATCTTGATGATAACGCCGCCGCTCGCGTAGGTATTCGTTCCCGTCCGATCAGCATG  907
              |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||  || | ||||||||| ||
Sbjct  82515  TTTCATCTTGATGATAACGCCGCCGCTCGCGTAGGTATTCGCGCCTGGCCGATCAGCGTG  82574

Query  908    CCAGGGAA-AAAC  919
               | ||||| ||||
Sbjct  82575  ACGGGGAATAAAC  82587
```

LAMPIRAN 3.2

Hasil Penjajaran Sekuens 9 ompC dengan database Protein di *genbank*

```
Sequences producing significant alignments:                      (Bits)
Value

ref|NP 456812.1|  outer membrane porin protein C [Salmonella e...   424    0.0
ref|ZP 02343501.1|  outer membrane protein C [Salmonella enter...   422    0.0
gb|ACH58565.1|  outer membrane protein [Salmonella enterica su...   422    0.0
ref|YP 001586981.1|  outer membrane porin protein C [Salmonell...   422    0.0
gb|ABS50230.1|  outer membrane protein C [Salmonella typhimurium]   424    0.0
ref|ZP 02654686.1|  outer membrane protein C [Salmonella enter...   421    0.0
ref|YP 001569688.1|  outer membrane porin protein C [Salmonell...   420    0.0
emb|CAA30688.1|  unnamed protein product [Salmonella typhi]         424    0.0
ref|ZP 03163898.1|  outer membrane protein C [Salmonella enter...   417    0.0
ref|ZP 02661500.1|  outer membrane protein C (Porin OmpC) [Sal...   415    0.0
ref|YP 217258.1|  outer membrane porin protein C [Salmonella e...   414    0.0
emb|CAB96613.1|  outer membrane protein C [Salmonella enterica...   410    0.0
gb|AAB96675.1|  outer membrane porin C [Salmonella enterica su...   411    0.0
gb|AAQ16585.1|  outer membrane protein C [Salmonella enterica ...   407    0.0
gb|AAL92500.1|  outer membrane protein [Salmonella enterica su...   397    1e-
177
gb|AAL92499.1|  outer membrane protein [Salmonella enterica su...   387    1e-
174
ref|YP 002141404.1|  outer membrane protein C [Salmonella ente...   424    6e-
166
ref|YP 002227186.1|  outer membrane protein C [Salmonella ente...   414    6e-
163
```

> ref|NP 456812.1| outer membrane porin protein C [Salmonella enterica subsp. enterica serovar Typhi str. CT18]

ref|NP 461210.1| outer membrane porin protein C [Salmonella typhimurium LT2]

ref|NP 804453.1| outer membrane porin protein C [Salmonella enterica subsp. enterica serovar Typhi str. Ty2]

35 more sequence titles

ref|YP 149910.1| outer membrane porin protein C [Salmonella enterica subsp. enterica serovar Paratyphi A str. ATCC 9150]

ref|ZP 02573695.1| outer membrane protein C [Salmonella enterica subsp. enterica serovar 4,[5],12:i:- str. CVM23701]

ref|ZP 02667312.1| outer membrane protein C [Salmonella enterica subsp. enterica serovar Heidelberg str. SL486]

ref|ZP 02683695.1| outer membrane protein C [Salmonella enterica subsp. enterica serovar Hadar str. RI_05P066]

ref|ZP 02699909.1| outer membrane protein C [Salmonella enterica subsp. enterica serovar Newport str. SL317]

ref|ZP 02830007.1| outer membrane protein C [Salmonella enterica subsp. enterica serovar Weltevreden str. HI_N05-537]

ref|YP 002041529.1| outer membrane protein C [Salmonella enterica subsp. enterica serovar Newport str. SL254]

ref|YP_002046322.1| outer membrane porin protein C [Salmonella enterica subsp. enterica serovar Heidelberg str. SL476]
ref|YP_002216337.1| outer membrane protein C [Salmonella enterica subsp. enterica serovar Dublin str. CT_02021853]
ref|ZP_03213439.1| outer membrane protein C [Salmonella enterica subsp. enterica serovar Virchow str. SL491]
ref|ZP_03352732.1| outer membrane porin protein C [Salmonella enterica subsp. enterica serovar Typhi str. E01-6750]
ref|ZP_03357722.1| outer membrane porin protein C [Salmonella enterica subsp. enterica serovar Typhi str. E02-1180]
ref|ZP_03367527.1| outer membrane porin protein C [Salmonella enterica subsp. enterica serovar Typhi str. E98-0664]
ref|ZP_03376289.1| outer membrane porin protein C [Salmonella enterica subsp. enterica serovar Typhi str. J185]
ref|ZP_03414165.1| outer membrane porin protein C [Salmonella enterica subsp. enterica serovar Typhi str. E98-3139]
ref|ZP_04657748.1| outer membrane porin protein C [Salmonella enterica subsp. enterica serovar Tennessee str. CDC07-0191]
sp|P0A263.1|OMPC_SALTY RecName: Full=Outer membrane protein C; AltName: Full=Porin ompC;
Flags: Precursor
sp|P0A264.1|OMPC_SALTI RecName: Full=Outer membrane protein C; AltName: Full=Porin ompC; Flags: Precursor
pir||AI0789 outer membrane protein C ompC [imported] - Salmonella enterica subsp. enterica serovar Typhi (strain CT18)
gb|AAA27169.1| outer membrane protein precursor [Salmonella enterica subsp. enterica serovar Typhimurium]
gb|AAL21169.1| outer membrane protein 1b (ib;c) [Salmonella enterica subsp. enterica serovar Typhimurium str. LT2]
emb|CAD07499.1| outer membrane protein C [Salmonella enterica subsp. enterica serovar Typhi]
gb|AAO68302.1| outer membrane protein C [Salmonella enterica subsp. enterica serovar Typhi str. Ty2]
gb|AAV76598.1| outer membrane protein C [Salmonella enterica subsp. enterica serovar Paratyphi A str. ATCC 9150]
gb|ACF64317.1| outer membrane protein C [Salmonella enterica subsp. enterica serovar Newport str. SL254]
gb|ACF68543.1| outer membrane protein C [Salmonella enterica subsp. enterica serovar Heidelberg str. SL476]
gb|EDX49750.1| outer membrane protein C [Salmonella enterica subsp. enterica serovar Newport str. SL317]
gb|ACH74704.1| outer membrane protein C [Salmonella enterica subsp. enterica serovar Dublin str. CT_02021853]
gb|EDZ02470.1| outer membrane protein C [Salmonella enterica subsp. enterica serovar Virchow str. SL491]
gb|EDZ15978.1| outer membrane protein C [Salmonella enterica subsp. enterica serovar 4,[5],12:i:- str. CVM23701]
gb|EDZ25069.1| outer membrane protein C [Salmonella enterica subsp. enterica serovar Heidelberg str. SL486]
gb|EDZ31661.1| outer membrane protein C [Salmonella enterica subsp. enterica serovar Weltevreden str. HI_N05-537]
gb|EDZ36133.1| outer membrane protein C [Salmonella enterica subsp. enterica serovar Hadar str. RI_05P066]

```
 gb|ACT66007.1|  outer membrane protein C protein-like protein precursor
[Salmonella enterica subsp. enterica serovar Typhimurium]
 gb|ACY89238.1|  outer membrane porin protein C [Salmonella enterica subsp.
enterica serovar Typhimurium str. 14028S]
Length=378

 GENE ID: 1248821 ompC | outer membrane porin protein C
[Salmonella enterica subsp. enterica serovar Typhi str. CT18]
(10 or fewer PubMed links)

 Score =  424 bits (1089),  Expect(4) = 0.0
 Identities = 207/210 (98%), Positives = 208/210 (99%), Gaps = 0/210 (0%)
 Frame = +1

Query  424    GYATYRNTDFFGLVDGLDFALQYQGKNGSVSGENTNGRSLLNQNGDGYGGSLTYAIGEGF
603
              GYATYRNTDFFGLVDGLDFALQYQGKNGSVSGENTNGRSLLNQNGDGYGGSLTYAIGEGF
Sbjct  148    GYATYRNTDFFGLVDGLDFALQYQGKNGSVSGENTNGRSLLNQNGDGYGGSLTYAIGEGF
207

Query  604    SVGGAITTSKRTADQNNTANARLYGNGDRATVYTGGLKYDANNIYLAAQYSRTYNATRFG
783
              SVGGAITTSKRTADQNNTANARLYGNGDRATVYTGGLKYDANNIYLAAQYS+TYNATRFG
Sbjct  208    SVGGAITTSKRTADQNNTANARLYGNGDRATVYTGGLKYDANNIYLAAQYSQTYNATRFG
267

Query  784    TFYGSNPSTSYGFANKAQNFEVVAQYQFDFGLRPSVAYLQSKGKDISNGYGASYGDQDIV
963
              T  GSNPSTSYGFANKAQNFEVVAQYQFDFGLRPSVAYLQSKGKDISNGYGASYGDQDIV
Sbjct  268    TSNGSNPSTSYGFANKAQNFEVVAQYQFDFGLRPSVAYLQSKGKDISNGYGASYGDQDIV
327

Query  964    KYVDVGATYYFNKNMSTYVDYKINLLDKND  1053
              KYVDVGATYYFNKNMSTYVDYKINLLDKND
Sbjct  328    KYVDVGATYYFNKNMSTYVDYKINLLDKND  357


 Score =  194 bits (493),  Expect(4) = 0.0
 Identities = 90/90 (100%), Positives = 90/90 (100%), Gaps = 0/90 (0%)
 Frame = +2

Query  47    EIYNKDGNKLDLFGKVDGLHYFSDDKGSDGDQTYMRIGFKGETQVNDQLTGYGQWEYQIQ  226
             EIYNKDGNKLDLFGKVDGLHYFSDDKGSDGDQTYMRIGFKGETQVNDQLTGYGQWEYQIQ
Sbjct  23    EIYNKDGNKLDLFGKVDGLHYFSDDKGSDGDQTYMRIGFKGETQVNDQLTGYGQWEYQIQ  82

Query  227   GNQTEGSNDSWTRVAFAGLKFADAGSFDYG  316
             GNQTEGSNDSWTRVAFAGLKFADAGSFDYG
Sbjct  83    GNQTEGSNDSWTRVAFAGLKFADAGSFDYG  112


 Score = 80.9 bits (198),  Expect(4) = 0.0
 Identities = 35/35 (100%), Positives = 35/35 (100%), Gaps = 0/35 (0%)
 Frame = +3

Query  321   NYGVTYDVTSWTDVLPEFGGDTYGADNFMQQRGNG  425
             NYGVTYDVTSWTDVLPEFGGDTYGADNFMQQRGNG
Sbjct  114   NYGVTYDVTSWTDVLPEFGGDTYGADNFMQQRGNG  148
```

```
 Score = 28.1 bits (61),  Expect(4) = 0.0
 Identities = 12/12 (100%), Positives = 12/12 (100%), Gaps = 0/12 (0%)
 Frame = +3

Query  1056  TRDAGINTDDIV  1091
              TRDAGINTDDIV
Sbjct  359   TRDAGINTDDIV  370


>  ref|ZP_02343501.1|  outer membrane protein C [Salmonella enterica subsp.
enterica serovar Saintpaul str. SARA29]
 gb|EDZ12997.1|  outer membrane protein C [Salmonella enterica subsp.
enterica serovar Saintpaul str. SARA29]
Length=378

 Score =  422 bits (1086),  Expect(4) = 0.0
 Identities = 206/210 (98%), Positives = 208/210 (99%), Gaps = 0/210 (0%)
 Frame = +1

Query  424   GYATYRNTDFFGLVDGLDFALQYQGKNGSVSGENTNGRSLLNQNGDGYGGSLTYAIGEGF
603
             GYATYRNTDFFGLVDGLDFALQYQGKNGSVSGENTNGRSLLNQNGDGYGGSLTYAIGEGF
Sbjct  148   GYATYRNTDFFGLVDGLDFALQYQGKNGSVSGENTNGRSLLNQNGDGYGGSLTYAIGEGF
207

Query  604   SVGGAITTSKRTADQNNTANARLYGNGDRATVYTGGLKYDANNIYLAAQYSRTYNATRFG
783
             SVGGAITTSKRTADQNNTANARLYGNGDRATVYTGGLKYDANNIYLAAQYS+TYNATRFG
Sbjct  208   SVGGAITTSKRTADQNNTANARLYGNGDRATVYTGGLKYDANNIYLAAQYSQTYNATRFG
267

Query  784   TFYGSNPSTSYGFANKAQNFEVVAQYQFDFGLRPSVAYLQSKGKDISNGYGASYGDQDIV
963
             T  G+NPSTSYGFANKAQNFEVVAQYQFDFGLRPSVAYLQSKGKDISNGYGASYGDQDIV
Sbjct  268   TSNGNNPSTSYGFANKAQNFEVVAQYQFDFGLRPSVAYLQSKGKDISNGYGASYGDQDIV
327

Query  964   KYVDVGATYYFNKNMSTYVDYKINLLDKND  1053
             KYVDVGATYYFNKNMSTYVDYKINLLDKND
Sbjct  328   KYVDVGATYYFNKNMSTYVDYKINLLDKND  357


 Score =  194 bits (493),  Expect(4) = 0.0
 Identities = 90/90 (100%), Positives = 90/90 (100%), Gaps = 0/90 (0%)
 Frame = +2

Query  47    EIYNKDGNKLDLFGKVDGLHYFSDDKGSDGDQTYMRIGFKGETQVNDQLTGYGQWEYQIQ  226
             EIYNKDGNKLDLFGKVDGLHYFSDDKGSDGDQTYMRIGFKGETQVNDQLTGYGQWEYQIQ
Sbjct  23    EIYNKDGNKLDLFGKVDGLHYFSDDKGSDGDQTYMRIGFKGETQVNDQLTGYGQWEYQIQ  82

Query  227   GNQTEGSNDSWTRVAFAGLKFADAGSFDYG  316
             GNQTEGSNDSWTRVAFAGLKFADAGSFDYG
Sbjct  83    GNQTEGSNDSWTRVAFAGLKFADAGSFDYG  112
```

```
 Score = 80.9 bits (198),  Expect(4) = 0.0
 Identities = 35/35 (100%), Positives = 35/35 (100%), Gaps = 0/35 (0%)
 Frame = +3

Query  321  NYGVTYDVTSWTDVLPEFGGDTYGADNFMQQRGNG  425
            NYGVTYDVTSWTDVLPEFGGDTYGADNFMQQRGNG
Sbjct  114  NYGVTYDVTSWTDVLPEFGGDTYGADNFMQQRGNG  148


 Score = 28.1 bits (61),  Expect(4) = 0.0
 Identities = 12/12 (100%), Positives = 12/12 (100%), Gaps = 0/12 (0%)
 Frame = +3

Query  1056  TRDAGINTDDIV  1091
             TRDAGINTDDIV
Sbjct  359   TRDAGINTDDIV  370
```

> gb|ACH58565.1| outer membrane protein [Salmonella enterica subsp. enterica serovar Typhi]
Length=376

```
 Score =  422 bits (1086),  Expect(4) = 0.0
 Identities = 206/210 (98%), Positives = 208/210 (99%), Gaps = 0/210 (0%)
 Frame = +1

Query  424    GYATYRNTDFFGLVDGLDFALQYQGKNGSVSGENTNGRSLLNQNGDGYGGSLTYAIGEGF
603
              GYATYRNTDFFGLVDGLDFALQYQGKNGSVSGENTNGRSLLNQNGDGYGGSLTYAIGEG+
Sbjct  146    GYATYRNTDFFGLVDGLDFALQYQGKNGSVSGENTNGRSLLNQNGDGYGGSLTYAIGEGY
205

Query  604    SVGGAITTSKRTADQNNTANARLYGNGDRATVYTGGLKYDANNIYLAAQYSRTYNATRFG
783
              SVGGAITTSKRTADQNNTANARLYGNGDRATVYTGGLKYDANNIYLAAQYS+TYNATRFG
Sbjct  206    SVGGAITTSKRTADQNNTANARLYGNGDRATVYTGGLKYDANNIYLAAQYSQTYNATRFG
265

Query  784    TFYGSNPSTSYGFANKAQNFEVVAQYQFDFGLRPSVAYLQSKGKDISNGYGASYGDQDIV
963
              T  GSNPSTSYGFANKAQNFEVVAQYQFDFGLRPSVAYLQSKGKDISNGYGASYGDQDIV
Sbjct  266    TSNGSNPSTSYGFANKAQNFEVVAQYQFDFGLRPSVAYLQSKGKDISNGYGASYGDQDIV
325

Query  964    KYVDVGATYYFNKNMSTYVDYKINLLDKND  1053
              KYVDVGATYYFNKNMSTYVDYKINLLDKND
Sbjct  326    KYVDVGATYYFNKNMSTYVDYKINLLDKND  355


 Score =  194 bits (493),  Expect(4) = 0.0
 Identities = 90/90 (100%), Positives = 90/90 (100%), Gaps = 0/90 (0%)
 Frame = +2

Query  47   EIYNKDGNKLDLFGKVDGLHYFSDDKGSDGDQTYMRIGFKGETQVNDQLTGYGQWEYQIQ  226
            EIYNKDGNKLDLFGKVDGLHYFSDDKGSDGDQTYMRIGFKGETQVNDQLTGYGQWEYQIQ
```

```
Sbjct  21    EIYNKDGNKLDLFGKVDGLHYFSDDKGSDGDQTYMRIGFKGETQVNDQLTGYGQWEYQIQ  80

Query  227   GNQTEGSNDSWTRVAFAGLKFADAGSFDYG  316
             GNQTEGSNDSWTRVAFAGLKFADAGSFDYG
Sbjct  81    GNQTEGSNDSWTRVAFAGLKFADAGSFDYG  110


 Score = 80.9 bits (198),  Expect(4) = 0.0
 Identities = 35/35 (100%), Positives = 35/35 (100%), Gaps = 0/35 (0%)
 Frame = +3

Query  321   NYGVTYDVTSWTDVLPEFGGDTYGADNFMQQRGNG  425
             NYGVTYDVTSWTDVLPEFGGDTYGADNFMQQRGNG
Sbjct  112   NYGVTYDVTSWTDVLPEFGGDTYGADNFMQQRGNG  146


 Score = 28.1 bits (61),  Expect(4) = 0.0
 Identities = 12/12 (100%), Positives = 12/12 (100%), Gaps = 0/12 (0%)
 Frame = +3

Query  1056  TRDAGINTDDIV  1091
             TRDAGINTDDIV
Sbjct  357   TRDAGINTDDIV  368
```

LAMPIRAN 3.3

Hasil Penjajaran sekuens 9 fimH dengan database Protein di *genbank*

Sequences producing significant alignments:	(Bits)	Value
ref|NP 455136.1| FimH protein precursor [Salmonella enterica ...	408	4e-112
gb|ABK76650.1| FimH [Salmonella enterica subsp. enterica sero...	394	6e-108
ref|YP 215573.1| minor fimbrial subunit [Salmonella enterica ...	394	1e-107
gb|ABK27328.1| fimbrial subunit [Salmonella enterica subsp. e...	392	4e-107
ref|YP 002636182.1| FimH protein precursor [Salmonella enteri...	391	6e-107
ref|ZP 02656603.1| mannose binding protein FimH [Salmonella e...	391	6e-107
ref|YP 002214501.1| mannose binding protein FimH [Salmonella ...	391	6e-107
ref|YP 002242676.1| FimH protein precursor [Salmonella enteri...	391	6e-107
ref|ZP 02830832.1| mannose binding protein FimH [Salmonella e...	390	8e-107
ref|YP 001589212.1| hypothetical protein SPAB_03016 [Salmonel...	390	8e-107
ref|YP 002225649.1| FimH protein precursor [Salmonella enteri...	390	1e-106
gb|ABL10287.1| FimH [Salmonella enterica subsp. enterica sero...	390	1e-106
gb|AAR83177.1| FimH [Salmonella enterica subsp. enterica sero...	390	1e-106
ref|ZP 02699533.1| mannose binding protein FimH [Salmonella e...	389	2e-106
ref|YP 002039791.1| mannose binding protein FimH [Salmonella ...	389	2e-106
ref|ZP 02665314.1| mannose binding protein FimH [Salmonella e...	389	2e-106
ref|ZP 02682983.1| mannose binding protein FimH [Salmonella e...	389	2e-106
gb|AAR83178.1| FimH [Salmonella enterica subsp. enterica sero...	389	3e-106
ref|YP 151379.1| FimH protein precursor [Salmonella enterica ...	388	4e-106
ref|ZP 03221493.1| mannose binding protein FimH [Salmonella e...	388	5e-106
ref|NP 459542.1| minor fimbrial subunit [Salmonella typhimuri...	388	5e-106
ref|ZP 02664105.1| mannose binding protein FimH [Salmonella e...	387	9e-106
ref|ZP 04655160.1| FimH protein precursor [Salmonella enteric...	386	2e-105
gb|ACC69033.1| FimH [Salmonella enterica subsp. enterica sero...	385	5e-105
ref|ZP 03217526.1| mannose binding protein FimH [Salmonella e...	385	5e-105
gb|AAA75420.1| FimH [Salmonella enterica subsp. enterica sero...	384	6e-105
ref|ZP 03387394.1| FimH protein precursor [Salmonella enteric...	357	1e-96

> ref|NP 455136.1| FimH protein precursor [Salmonella enterica subsp. enterica serovar Typhi str. CT18]
ref|NP 806050.1| FimH protein precursor [Salmonella enterica subsp. enterica serovar Typhi str. Ty2]
ref|ZP 03336711.1| FimH protein precursor [Salmonella enterica subsp. enterica serovar Typhi str. 404ty]
10 more sequence titles

ref|ZP 03345651.1| FimH protein precursor [Salmonella enterica subsp. enterica serovar Typhi str. E00-7866]
ref|ZP 03353503.1| FimH protein precursor [Salmonella enterica subsp. enterica serovar Typhi str. E01-6750]
ref|ZP 03358008.1| FimH protein precursor [Salmonella enterica subsp. enterica serovar Typhi str. E02-1180]
ref|ZP 03364161.1| FimH protein precursor [Salmonella enterica subsp. enterica serovar Typhi str. E98-0664]
ref|ZP 03371515.1| FimH protein precursor [Salmonella enterica subsp. enterica serovar Typhi str. E98-2068]

```
 ref|ZP_03377107.1|  FimH protein precursor [Salmonella enterica subsp.
enterica serovar Typhi str. J185]
 ref|ZP_03410278.1|  FimH protein precursor [Salmonella enterica subsp.
enterica serovar Typhi str. E98-3139]
 pir||AC0570  FimH protein precursor [imported] - Salmonella enterica subsp.
enterica serovar Typhi (strain CT18)
 emb|CAD05029.1|  FimH protein precursor [Salmonella enterica subsp.
enterica serovar Typhi]
 gb|AAO69910.1|  FimH protein precursor [Salmonella enterica subsp.
enterica serovar Typhi str. Ty2]
Length=335

 GENE ID: 1247061 fimH | FimH protein precursor
[Salmonella enterica subsp. enterica serovar Typhi str. CT18]
(10 or fewer PubMed links)

 Score =  408 bits (1049),  Expect = 4e-112
 Identities = 223/298 (74%), Positives = 238/298 (79%), Gaps = 5/298 (1%)
 Frame = +2

Query  35   RNWGGTATDIFYDLSDVFTSGNNQPGQVVTLLKKSDWCGVNATCPAGTTVNYPYRSYVSE  214
            RN  GTATDIFYDLSDVFTSGNNQPGQVVTLLKKSDWCGVNATCPAGTTVNY YRSYVSE
Sbjct  26   RNSNGTATDIFYDLSDVFTSGNNQPGQVVTLLKKSDWCGVNATCPAGTTVNYTYRSYVSE  85

Query  215  LPVQSTERNFKYLKLNDYLLGAMSITDSVAGVFYPPRNYIRMGVDSNVSQQKPFGVQDSK  394
            LPVQSTE NFKYLKLNDYLLGAMSITDSVAGVFYPPRNYIRMGVDSNVSQQKPFGVQDSK
Sbjct  86   LPVQSTEGNFKYLKLNDYLLGAMSITDSVAGVFYPPRNYIRMGVDSNVSQQKPFGVQDSK  145

Query  395  LVFKLKVIRPFINIVTIPRQTMFTVYVTTSTGDALSTPVYTISYSGKVEVPQKL*SECRT  574
            LVFKLKVIRPFINIVTIPRQTMFTVYVTTSTGDALSTPVYTISYSGKVEVPQ    E
Sbjct  146  LVFKLKVIRPFINIVTIPRQTMFTVYVTTSTGDALSTPVYTISYSGKVEVPQN--CEVNA  203

Query  575  GRGV*FS-AISGAPLF*sggsg*ssARRHAASENYRYQMSNLRGASLFIDAALNPKRPQG  751
            G+ V F     GAPLF   G+G         ++    + +N+  A  ++   L  ++  G
Sbjct  204  GQVVEFDFGDIGAPLFSQAGAGNRPQGVTPQAKTIAIKCTNV-AAQAYLSMRLEAEKASG  262

Query  752  KAMVSDNRVLGSGVCNKHRRRLIPNNLSSKIPFHLDDNAAARVGIRSRPISMPGKNSP  925
            +AMVSDN  LG  V N +   L PNNLSSKIPFHLDDNAAARVGIR+ PIS+ G N P
Sbjct  263  QAMVSDNPDLGFVVANSNGTPLTPNNLSSKIPFHLDDNAAARVGIRAWPISVTG-NKP  319


>  gb|ABK76650.1|  FimH [Salmonella enterica subsp. enterica serovar
Choleraesuis]
Length=335

 Score =  394 bits (1013),  Expect = 6e-108
 Identities = 217/298 (72%), Positives = 235/298 (78%), Gaps = 5/298 (1%)
 Frame = +2

Query  35   RNWGGTATDIFYDLSDVFTSGNNQPGQVVTLLKKSDWCGVNATCPAGTTVNYPYRSYVSE  214
            RN  GTATDIFYDLSDVFTSGNNQPGQVVTLL+KS W GVNATCPAGTTVNY YRSYVSE
Sbjct  26   RNSNGTATDIFYDLSDVFTSGNNQPGQVVTLLEKSGWVGVNATCPAGTTVNYTYRSYVSE  85

Query  215  LPVQSTERNFKYLKLNDYLLGAMSITDSVAGVFYPPRNYIRMGVDSNVSQQKPFGVQDSK  394
            LPV+STE NFKYLKLNDYLLGAMSITDSVAGVFYPPRNYIRMGVDSNVSQQKPFGVQDSK
```

```
Sbjct  86   LPVRSTEGNFKYLKLNDYLLGAMSITDSVAGVFYPPRNYIRMGVDSNVSQQKPFGVQDSK  145

Query  395  LVFKLKVIRPFINIVTIPRQTMFTVYVTTSTGDALSTPVYTISYSGKVEVPQKL*SECRT  574
            LVFKLKVIRPFIN+VTIPRQTMFTVYVTTSTGDALSTPVYTISYSGKVEVPQ    E
Sbjct  146  LVFKLKVIRPFINMVTIPRQTMFTVYVTTSTGDALSTPVYTISYSGKVEVPQN--CEVNA  203

Query  575  GRGV*FS-AISGAPLF*sggsg*ssARRHAASENYRYQMSNLRGASLFIDAALNPKRPQG  751
            G+ V F     GA LF   G+G         ++    + +N+  A  ++   L  ++  G
Sbjct  204  GQVVEFDFGDIGASLFSQAGAGNRPQGVTPQTKTIAIKCTNV-AAQAYLSMRLEAEKASG  262

Query  752  KAMVSDNRVLGSGVCNKHRRRLIPNNLSSKIPFHLDDNAAARVGIRSRPISMPGKNSP  925
            +AMVSDN  LG  V N +    L PNNLSSKIPFHLDDNAAARVGIR+ PIS+ G N P
Sbjct  263  QAMVSDNPDLGFVVANSNGTPLTPNNLSSKIPFHLDDNAAARVGIRAWPISVTG-NKP  319
```

> ref|YP_215573.1| G minor fimbrial subunit [Salmonella enterica subsp. enterica serovar Choleraesuis str. SC-B67]
gb|AAX64492.1| G minor fimbrial subunit [Salmonella enterica subsp. enterica serovar Choleraesuis str. SC-B67]
Length=335

GENE ID: 3333012 fimH | minor fimbrial subunit
[Salmonella enterica subsp. enterica serovar Choleraesuis str. SC-B67]
(10 or fewer PubMed links)

```
 Score =  394 bits (1011),  Expect = 1e-107
 Identities = 217/298 (72%), Positives = 235/298 (78%), Gaps = 5/298 (1%)
 Frame = +2

Query  35   RNWGGTATDIFYDLSDVFTSGNNQPGQVVTLLKKSDWCGVNATCPAGTTVNYPYRSYVSE  214
            RN  GTATDIFYDLSDVFTSGNNQPGQVVTLL+KS W GVNATCPAGTTVNY YRSYVSE
Sbjct  26   RNSNGTATDIFYDLSDVFTSGNNQPGQVVTLLEKSGWGGVNATCPAGTTVNYTYRSYVSE  85

Query  215  LPVQSTERNFKYLKLNDYLLGAMSITDSVAGVFYPPRNYIRMGVDSNVSQQKPFGVQDSK  394
            LPV+STE NFKYLKLNDYLLGAMSITDSVAGVFYPPRNYIRMGVDSNVSQQKPFGVQDSK
Sbjct  86   LPVRSTEGNFKYLKLNDYLLGAMSITDSVAGVFYPPRNYIRMGVDSNVSQQKPFGVQDSK  145

Query  395  LVFKLKVIRPFINIVTIPRQTMFTVYVTTSTGDALSTPVYTISYSGKVEVPQKL*SECRT  574
            LVFKLKVIRPFIN+VTIPRQTMFTVYVTTSTGDALSTPVYTISYSGKVEVPQ    E
Sbjct  146  LVFKLKVIRPFINMVTIPRQTMFTVYVTTSTGDALSTPVYTISYSGKVEVPQN--CEVNA  203

Query  575  GRGV*FS-AISGAPLF*sggsg*ssARRHAASENYRYQMSNLRGASLFIDAALNPKRPQG  751
            G+ V F     GA LF   G+G         ++    + +N+  A  ++   L  ++  G
Sbjct  204  GQVVEFDFGDIGASLFSQAGAGNRPQGVTPQTKTIAIKCTNV-AAQAYLSMRLEAEKASG  262

Query  752  KAMVSDNRVLGSGVCNKHRRRLIPNNLSSKIPFHLDDNAAARVGIRSRPISMPGKNSP  925
            +AMVSDN  LG  V N +    L PNNLSSKIPFHLDDNAAARVGIR+ PIS+ G N P
Sbjct  263  QAMVSDNPDLGFVVANSNGTPLTPNNLSSKIPFHLDDNAAARVGIRAWPISVTG-NKP  319
```

> gb|ABK27328.1| fimbrial subunit [Salmonella enterica subsp. enterica serovar Infantis]
Length=335

```
 Score =  392 bits (1006),  Expect = 4e-107
```

```
 Identities = 216/298 (72%), Positives = 233/298 (78%), Gaps = 5/298 (1%)
 Frame = +2

Query  35   RNWGGTATDIFYDLSDVFTSGNNQPGQVVTLLKKSDWCGVNATCPAGTTVNYPYRSYVSE  214
            RN  GT TDIFYDLSDVFTSGNNQPGQVVTL +KS W GVNATCPAGTTVNY YRSYVSE
Sbjct  26   RNSNGTVTDIFYDLSDVFTSGNNQPGQVVTLPEKSGWVGVNATCPAGTTVNYTYRSYVSE  85

Query  215  LPVQSTERNFKYLKLNDYLLGAMSITDSVAGVFYPPRNYIRMGVDSNVSQQKPFGVQDSK  394
            LPVQSTE NFKYLKLNDYLLGAMSITDSVAGVFYPPRNYIRMGVDSNVSQQKPFGVQDSK
Sbjct  86   LPVQSTEGNFKYLKLNDYLLGAMSITDSVAGVFYPPRNYIRMGVDSNVSQQKPFGVQDSK  145

Query  395  LVFKLKVIRPFINIVTIPRQTMFTVYVTTSTGDALSTPVYTISYSGKVEVPQKL*SECRT  574
            LVFKLKVIRPFIN+VTIPRQTMFTVYVTTSTGDALSTPVYTISYSGKVEVPQ     E
Sbjct  146  LVFKLKVIRPFINMVTIPRQTMFTVYVTTSTGDALSTPVYTISYSGKVEVPQN--CEVNA  203

Query  575  GRGV*FS-AISGAPLF*sggsg*ssARRHAASENYRYQMSNLRGASLFIDAALNPKRPQG  751
            G+ V F     GA LF   G+G         ++     + +N+  A  ++    L  ++  G
Sbjct  204  GQVVEFDFGDIGASLFSQAGAGNRPQGVTPQTKTIAIKCTNV-AAQAYLSMRLEAEKASG  262

Query  752  KAMVSDNRVLGSGVCNKHRRRLIPNNLSSKIPFHLDDNAAARVGIRSRPISMPGKNSP  925
            +AMVSDN   LG  V N +    L PNNLSSKIPFHLDDNAAARVGIR+ PIS+ G N P
Sbjct  263  QAMVSDNPDLGFVVANSNGTPLTPNNLSSKIPFHLDDNAAARVGIRAWPISVTG-NKP  319
```

> ref|YP_002636182.1| G FimH protein precursor [Salmonella enterica subsp. enterica serovar Paratyphi C strain RKS4594]
gb|ACN44741.1| G FimH protein precursor [Salmonella enterica subsp. enterica serovar Paratyphi C strain RKS4594]
Length=335

GENE ID: 7553049 fimH | FimH protein precursor
[Salmonella enterica subsp. enterica serovar Paratyphi C strain RKS4594]
(10 or fewer PubMed links)

```
 Score =  391 bits (1004),  Expect = 6e-107
 Identities = 216/298 (72%), Positives = 234/298 (78%), Gaps = 5/298 (1%)
 Frame = +2

Query  35   RNWGGTATDIFYDLSDVFTSGNNQPGQVVTLLKKSDWCGVNATCPAGTTVNYPYRSYVSE  214
            RN  GTATDIFYDLSDVFTSGNNQPGQVVTL +KS W GVNATCPAGTTVNY YRSYVSE
Sbjct  26   RNSNGTATDIFYDLSDVFTSGNNQPGQVVTLPEKSGWVGVNATCPAGTTVNYTYRSYVSE  85

Query  215  LPVQSTERNFKYLKLNDYLLGAMSITDSVAGVFYPPRNYIRMGVDSNVSQQKPFGVQDSK  394
            LPV+STE NFKYLKLNDYLLGAMSITDSVAGVFYPPRNYIRMGVDSNVSQQKPFGVQDSK
Sbjct  86   LPVRSTEGNFKYLKLNDYLLGAMSITDSVAGVFYPPRNYIRMGVDSNVSQQKPFGVQDSK  145

Query  395  LVFKLKVIRPFINIVTIPRQTMFTVYVTTSTGDALSTPVYTISYSGKVEVPQKL*SECRT  574
            LVFKLKVIRPFIN+VTIPRQTMFTVYVTTSTGDALSTPVYTISYSGKVEVPQ     E
Sbjct  146  LVFKLKVIRPFINMVTIPRQTMFTVYVTTSTGDALSTPVYTISYSGKVEVPQN--CEVNA  203

Query  575  GRGV*FS-AISGAPLF*sggsg*ssARRHAASENYRYQMSNLRGASLFIDAALNPKRPQG  751
            G+ V F     GA LF   G+G         ++     + +N+  A  ++    L  ++  G
Sbjct  204  GQVVEFDFGDIGASLFSQAGAGNRPQGVTPQTKTIAIKCTNV-AAQAYLSMWLEAEKASG  262

Query  752  KAMVSDNRVLGSGVCNKHRRRLIPNNLSSKIPFHLDDNAAARVGIRSRPISMPGKNSP  925
            +AMVSDN   LG  V N +    L PNNLSSKIPFHLDDNAAARVGIR+ PIS+ G N P
```

```
Sbjct  263  QAMVSDNPDLGFVVANSNGTPLTPNNLSSKIPFHLDDNAAARVGIRAWPISVTG-NKP  319
```

> ref|ZP_02656603.1| mannose binding protein FimH [Salmonella enterica subsp. enterica serovar Kentucky str. CDC 191]
ref|ZP_03075383.1| mannose binding protein FimH [Salmonella enterica subsp. enterica serovar Kentucky str. CVM29188]
gb|EDX44602.1| mannose binding protein FimH [Salmonella enterica subsp. enterica serovar Kentucky str. CVM29188]
gb|EDZ20737.1| mannose binding protein FimH [Salmonella enterica subsp. enterica serovar Kentucky str. CDC 191]
Length=335

```
 Score =  391 bits (1004),  Expect = 6e-107
 Identities = 216/298 (72%), Positives = 233/298 (78%), Gaps = 5/298 (1%)
 Frame = +2

Query  35   RNWGGTATDIFYDLSDVFTSGNNQPGQVVTLLKKSDWCGVNATCPAGTTVNYPYRSYVSE  214
            RN  GTATDIFYDLSDVFTSGNNQPGQVVTL +KS W GVNATCPAGTTVNY YRSYVSE
Sbjct  26   RNSNGTATDIFYDLSDVFTSGNNQPGQVVTLPEKSGWVGVNATCPAGTTVNYTYRSYVSE  85

Query  215  LPVQSTERNFKYLKLNDYLLGAMSITDSVAGVFYPPRNYIRMGVDSNVSQQKPFGVQDSK  394
            LPVQSTE NFKYLKLNDYLLGAMSITDSVAGVFYPPRNYIRMGVDSNVSQQ PFGVQDSK
Sbjct  86   LPVQSTEGNFKYLKLNDYLLGAMSITDSVAGVFYPPRNYIRMGVDSNVSQQMPFGVQDSK  145

Query  395  LVFKLKVIRPFINIVTIPRQTMFTVYVTTSTGDALSTPVYTISYSGKVEVPQKL*SECRT  574
            LVFKLKVIRPFIN+VTIPRQTMFTVYVTTSTGDALSTPVYTISYSGKVEVPQ    E
Sbjct  146  LVFKLKVIRPFINMVTIPRQTMFTVYVTTSTGDALSTPVYTISYSGKVEVPQN--CEVNA  203

Query  575  GRGV*FS-AISGAPLF*sggsg*ssARRHAASENYRYQMSNLRGASLFIDAALNPKRPQG  751
            G+ V F     GA LF   G+G         ++    + +N+  A  ++   L  ++  G
Sbjct  204  GQVVEFDFGDIGASLFSQAGAGNRPQGVTPQTKTIAIKCTNV-AAQAYLSMRLEAEKASG  262

Query  752  KAMVSDNRVLGSGVCNKHRRRLIPNNLSSKIPFHLDDNAAARVGIRSRPISMPGKNSP  925
            +AMVSDN  LG  V N +   L PNNLSSKIPFHLDDNAAARVGIR+ PIS+ G N P
Sbjct  263  QAMVSDNPDLGFVVANSNGTPLTPNNLSSKIPFHLDDNAAARVGIRAWPISVTG-NKP  319
```