



Analysis of genetic variation of the outer membrane protein (omp) gene sequence in *Salmonella enterica subsp. enterica* using RFLP *in silico*

Aditya Willy Putra, Fitri Sahara, Ilham Rizky Ritonga, Sari Ramadhani, Tasya Evi Wardhani, Afifatul Achyar.

Universitas Negeri Padang, Padang
Afifatul.achyar@fmipa.unp.ac.id

Abstract

The OMP (Outer membrane protein) gene is a class of unique integral membrane proteins anchored in OM, whose β -barrel structure is formed by 8 to 26 strands. *Salmonella enterica* is a rod-shaped, flagellate, facultative anaerobic, Gram-negative bacterium and a species of the genus *Salmonella*. There were 17 samples of *Salmonella enterica* gene sequences analyzed. This study aimed to analyze genetic variation in outer membrane protein (OMP) gene sequences in *Salmonella enterica* bacteria NCBI PopSet 1817659977 using in-silico RFLP by free bioinformatics tools on the internet.. DNA sequences are cut using 2 types of restrictive enzymes namely *Bgl*II and *Taq*I. The in-silico RFLP results in this study showed that there were genetic variations in the recognition site of the *Bgl*II enzymes (A1 allele and A2 allele) and *Taq*I (B1 allele and B2 allele) in 17 DNA sequences of the OMP gene for *Salmonella enterica* bacteria NCBI PopSet 1817659977. The sources of genetic variation include mutations, migration and recombination.

Keyword : OMP gene, RFLP, Genetic Variation, *Salmonella enterica*

PENDAHULUAN

Amplikasi hukum Hardy-Weinberg berbicara mengenai genetika populasi. Genetika populasi adalah studi tentang variasi genetik pada suatu populasi yang terkait dengan perubahan yang terjadi pada frekuensi alel dan perubahan yang menyertai di suatu populasi.

Indonesia merupakan salah satu negara dengan keanekaragaman hayati sangat tinggi (megabiodiversity). Keanekaragaman hayati adalah ketersediaan keanekaragaman sumber daya hayati berupa jenis maupun kekayaan plasma nutfah (keanekaragaman genetik di dalam jenis), keanekaragaman antar jenis dan keanekaragaman ekosistem (Sudarsono, 2005).

Keanekaragaman genetik merupakan variasi genetik dalam satu spesies baik di antara populasi-populasi yang terpisah secara geografik maupun di antara individu-individu dalam satu populasi. Keanekaragaman gen adalah segala perbedaan yang ditemui pada makhluk hidup dalam satu spesies (Indrawan et al., 2007). Pengetahuan tentang keragaman genetik sangat penting karena akan memberikan suatu informasi dasar dalam pengembangan selanjutnya.

Dalam keanekaragaman yang tinggi menyimpan gen berpotensi tinggi pula (Suryanto, 2003). Perkembangan ilmu pengetahuan mempermudah mendeteksi keragaman genetik suatu individu berbasis molekuler. Keanekaragaman genetik dapat terjadi karena adanya perubahan nukleotida penyusun DNA. Perubahan ini mungkin dapat memengaruhi fenotipe suatu organisme yang dapat dipantau dengan mata telanjang, atau memengaruhi reaksi individu terhadap lingkungan tertentu.

Secara umum keanekaragaman genetic dari suatu populasi dapat terjadi karena adanya mutasi, rekombinasi, atau migrasi gen dari satu tempat ketempat lain (Suryanto, 2003).

Kebanyakan keturunan spesies mewarisi separuh gennya dari induk betina dan separuhnya lagi dari induk jantan, dengan demikian susunan genetiknya berbeda dengan kedua induknya atau dengan individu yang lain di dalam populasi (Indrawan et al., 2007). Keanekaragaman genetic juga dipengaruhi oleh perkawinan antara jantan dan betina. Adanya perkawinan sedarah akan memengaruhi frekuensi alel dan menambah variasi genetic dalam suatu populasi. Molecular sexing berdasarkan PCR (Polymerase Chain Reaction) merupakan metode yang tepat, cepat dan efektif untuk melakukan sexing (Reddy et al., 2007).

Salmonella merupakan bakteri gram-negatif berbentuk batang yang terdapat dalam usus manusia maupun binatang dikelompokkan dalam family enterobacteriaceae (Brooks, 2005). Walaupun Salmonella menjadi bakteri paling kompleks diantara family enterobacteriaceae lainnya karena memiliki lebih dari 2400 serotipe dari antigen bakteri ini, telah disepakati bahwa hanya terdapat dua spesies yakni *Salmonella bongori* dan *Salmonella enterica* dengan enam subspecies.

1. Klasifikasi *salmonella enterica* (itis.gov)

Kingdom	: Bacteria
Subkingdom	: Negibacteria
Phylum	: Proteobacteria
Class	: Gammaproteobacteria
Order	: Enterobacteriales
Family	: Enterobacteriaceae
Genus	: Salmonella
Spesies	: <i>Salmonella enterica</i>

2. Struktur dan Morfologi *Salmonella enterica*

Morfologi bakteri Salmonella mempunyai ciri-ciri umum sebagai berikut: berbentuk batang atau silindris, ukurannya tergantung dari jenis bakteri (umumnya mempunyai panjang $\pm 2 \mu\text{m}$ — $3 \mu\text{m}$ dan bergaris tengah $\pm 0,3 \mu\text{m}$ - $0,6 \mu\text{m}$), tidak berspora, motil, bersifat aerob, mempunyai flagella peritrih di seluruh permukaan selnya (kecuali pada jenis bakteri Salmonella gallinarum dan Salmonella pullorum), bersifat gram negative berkembangbiak dengan cara membelah diri. Pada temperature kamar bakteri Salmonella ini dapat berkembang dengan cepat. Struktur sel bakteri Salmonella terdiri atas bagian inti (nucleus), sitoplasma dan dinding sel. Dinding sel bakteri ini bersifat gram negatif, sehingga mempunyai struktur kimia yang berbeda dengan bakteri gram positif. (Bonang, 1982) mengemukakan bahwa struktur dinding sel bakteri gram negative mengandung 3 polimer senyawa muko kompleks yang terletak di luar lapisan peptidoglikan (murein). Ketiga polimer ini terdiri dari:

1. Lipoprotein adalah senyawa protein yang mempunyai fungsi menghubungkan antara selaput luar dengan lapisan peptidoglikan (murein).
2. Selaput luar adalah merupakan selaput ganda yang mengandung senyawa fosfolipid dan sebagian besar dari senyawa fosfolipid ini terikat oleh molekul-molekul lipopolisakarida pada lapisan atasnya.

3. Lipopolisakarida adalah senyawa yang mengandung lipid yang kompleks Molekul-molekul lipopolisakarida ini berfungsi sebagai penyusun dinding sel bakteri gram negatif yang dapat mengeluarkan sejenis racun (toxin) yang disebut endotoksin. Endotoksin ini dikeluarkan apabila terjadi luka pada permukaan sel bakteri gram negative tersebut.

OMP adalah kelas protein membran integral unik yang berlabuh di OM, yang struktur β -barelnya dibentuk oleh 8 hingga 26 helai. Ada loop besar dan memanjang antara untaian di sisi ekstraseluler dan loop pendek di sisi periplasma. Karakteristik ini memberi OMP stabilitas tinggi dalam membran dan kemampuan bertarung melawan lingkungan yang sangat keras. Meskipun OMP yang berbeda memiliki urutan dan fungsi yang berbeda, mereka memiliki struktur dan sifat biologis yang sama. OMP bakteri terdiri dari untaian angka genap, dan yang penting fungsi dan jumlah geser berdiri tergantung pada urutannya. Misalnya, sebagai protein terkait virulensi, melengkapi protein mengikat OmpX di *E.coli* dan fibronectin dan protein pengikat heparin Ail dalam pestis *Yersinia* berbagi struktur serupa yang mampu dibandingkan, tetapi identitas urutan mereka lebih rendah dari 45%. Keragaman urutan OMP terjadi di terminal N secara substansial lebih dari terminal C, dan sinyal β yang dikonturkan mengontrol pelipatan dan perakitan OMP yang benar (Nie et al., 2020).

Uji *in silico* adalah suatu istilah untuk percobaan atau uji yang dilakukan dengan melalui simulasi computer. Uji *in silico* telah menjadi metode yang digunakan untuk mengawali penemuan senyawa obat baru dan untuk meningkatkan efisiensi dalam optimasi aktivitas senyawa induk. Energi interaksi molekul antara reseptor dan ligan pada penelitian ini dilakukan dengan melihat nilai Rerank Score. Uji *in silico* dilakukan dengan melakukan docking molekul kandidat senyawa obat dengan reseptor yang dipilih. Docking adalah suatu upaya untuk menselaraskan antara ligan yang merupakan molekul kecil ke dalam reseptor yang merupakan molekul protein yang besar, dengan memperhatikan sifat keduanya satu sama lain (Harjono, 2013).

Berdasarkan uraian di atas, maka studi ini bertujuan untuk menganalisis variasi genetik pada sekuen gen outer membrane protein (OMP) pada bakteri *Salmonella enterica* menggunakan *Restriction- Fragment Length Polymorphism* (RFLP) secara *in silico*.

2. BAHAN DAN METODE

2.1 Bahan

Sekuen gen OMP bakteri *Salmonella enterica* yang digunakan untuk uji *in silico* diunduh dalam format fasta dari NCBI dengan nomor identitas NCBI PopSet 1817659977 yang dikirimkan oleh Le,H.Q., Chu,T.T.H., Dao,T.T., Ha,H.T.T., Dang,S.T., Truong,D.T.Q., Tran,N.T. and Truong,G.T.H. (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/popset/1817659977>) . Dalam PopSet tersebut terdapat 17 sekuen gen pengkode outer membrane protein bakteri *Salmonella enterica*, region outer membrane protein berukuran 276 bp (*partial cds*) dengan nomor identitas GenBank MN207281.1-MN207297.1. Le, H. Q. *et al.* (2019) mendeskripsikan bahwa sekuen tersebut diisolasi dari kultur sel 17 isolat bakteri *Salmonella enterica* di Animal Cell Biotechnology, Institute of Biotechnology, Hanoi, Vietnam.

2.2 Metode

2.2.1 Skrining kandidat enzim restriksi

Skrining kandidat enzim restriksi yang akan dipakai pada RFLP *in silico* dilakukan dengan *tools* pada situs <http://insilico.ehu.es/restriction/>. *Tools* ini akan membandingkan pola restriksi dari banyak sekuen DNA yang diuji serta enzim restriksi yang memotongnya. Pada situs tersebut, *tools* yang dipilih adalah “*compare restriction pattern of many sequences*”. Sekuen gen yang sudah diunduh dalam bentuk *fasta*, diunggah pada kolom yang disediakan. Pada langkah selanjutnya akan terlihat hasil *alignment* masing-masing sekuen dan sekuen yang sama akan dibuang untuk mempermudah analisis. Langkah selanjutnya, opsi “*only restriction enzymes with known bases (no N,R,Y...)*” dipilih agar mendapatkan enzim restriksi dengan sisi pengenalan restriksi yang pasti. Kemudian tombol “*get the list restriction enzyme*” dipilih untuk memperoleh kandidat enzim restriksi yang akan digunakan pada tahap berikutnya.

2.2.2 RFLP secara *in silico*

Restriction-Fragment Length Polymorphism (RFLP) secara *in silico* atau restriksi secara virtual dilakukan menggunakan *tools* pada situs <https://www.benchling.com/>. Situs ini gratis tetapi harus melakukan registrasi untuk membuat akun menggunakan email. Tahap awal yang dilakukan adalah melakukan import 17 sekuen DNA gen OMP yang sudah diunduh dari NCBI ke dalam folder project di situs Benchling. Restriksi *in silico* dilakukan dengan mengklik simbol gunting pada pojok kanan layar. Kemudian *tools* “*find enzyme*” dipilih dan nama enzim restriksi yang sudah ditentukan sebelumnya pada saat skrining, diketikkan pada kolom yang tersedia. Selanjutnya, menu “*run digest*” diklik untuk melakukan restriksi. Adapun gambar elektroforegram diperoleh dengan mengklik menu “*virtual digest*”.

3. Hasil dan Pembahasan

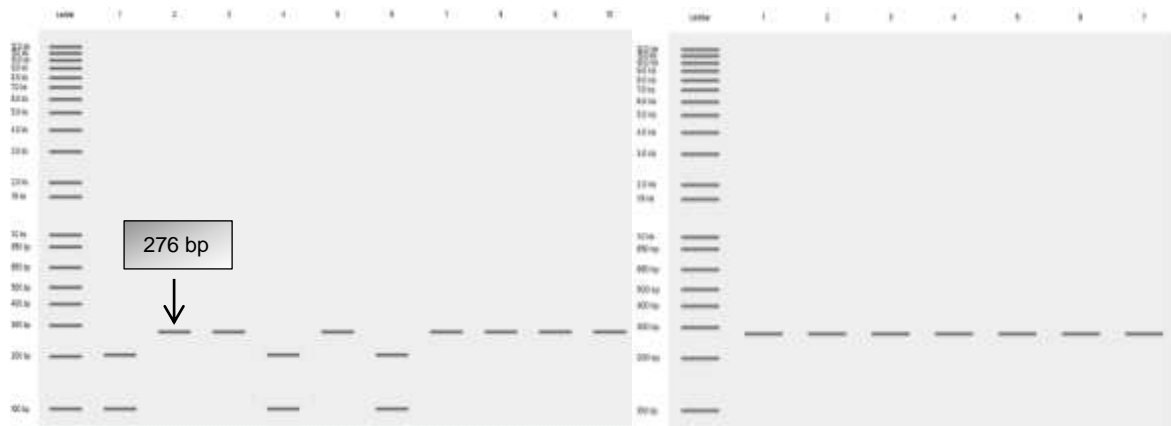
3.1 Skrining kandidat enzim restriksi

Berdasarkan output yang diperoleh dari skrining kandidat enzim restriksi pada situs <http://insilico.ehu.es/restriction/>, terdapat 61 sisi pengenalan enzim restriksi diantaranya A'GATC_T yang dikenali oleh enzim *BglII* dan T'CG_A yang dikenali oleh enzim *TaqI*. Kedua sisi pengenalan ini dipilih karena menunjukkan variasi sisi pemotongan pada semua sekuen gen OMP bakteri *Salmonella enterica* dalam PopSet 1817659977.

3.2 RFLP secara *in silico*

RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) adalah teknik yang umum digunakan untuk penentuan genotip (*genotyping*) melalui pemotongan sekuen DNA dengan enzim restriksi. Fragmen DNA hasil restriksi dipisahkan menggunakan elektroforesis dan divisualisasi menggunakan teknik *Southern Blotting* (Dai dan Long, 2015). Menurut Siti et al., (2013) metode RFLP sebagai salah satu metode untuk mengetahui polimorfisme dalam mengkaji sejarah evolusi populasi manusia (*garis keturunan/silsilah*) dan untuk mengetahui adanya mutasi. Metode RFLP adalah metode analisis menggunakan enzim restriksi yang memotong urutan nukleotida khas pada lokasi tertentu yang berbeda sehingga dihasilkan fragmen yang panjangnya berbeda-beda (Theodore, 2000).

RFLP secara *in silico* pada 17 sekuen DNA gen *OMP* bakteri *Salmonella enterica* NCBI PopSet 1817659977 dilakukan pada aplikasi Benchling menggunakan enzim restriksi yang telah dipilih pada tahap skrining kandidat enzim restriksi, yakni enzim *Bgl*II dan *Taq*I. Hasil RFLP *in silico* divisualisasikan dengan elektroforesis gel virtual seperti pada Gambar 1 untuk restriksi dengan enzim *Bgl*II dan Gambar 2 untuk restriksi dengan enzim *Taq*I.

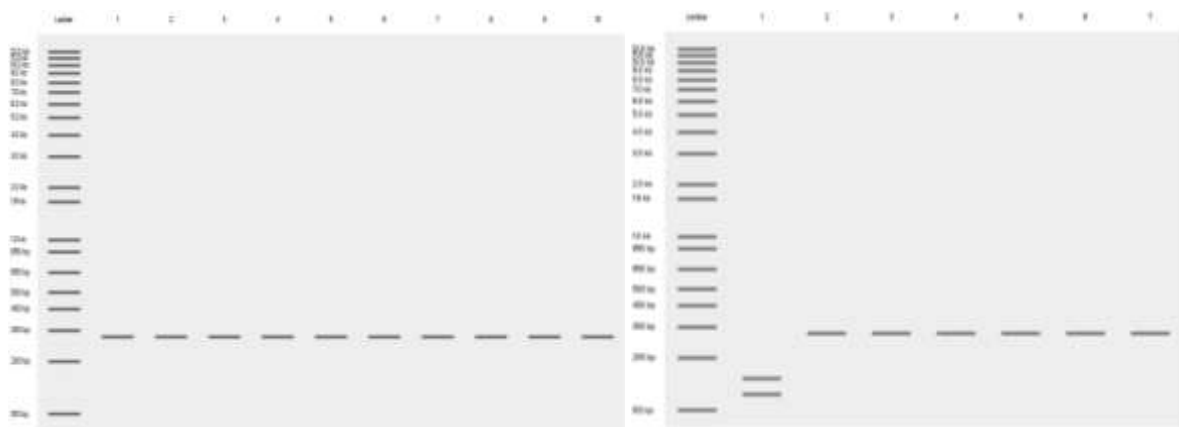


Gambar 1. Elektroforegram hasil restriksi dengan enzim *Bgl*II secara *in silico*.

Kiri : Ladder Life 1 kb plus : MN207281.1, MN207282.1, MN207283.1, MN207284.1, MN207285.1, MN207286.1, MN207287.1, MN207288.1, MN207289.1, MN207290.1;

Kanan : Ladder Life 1 kb plus : MN207291.1, MN207292.1, MN207293.1, MN207294.1, MN207295.1, MN207296.1, MN207297.1.

Restriksi dengan enzim *Bgl*II pada 17 DNA gen *OMP* bakteri *Salmonella enterica* menghasilkan dua variasi alel, yaitu alel A1 yang menghasilkan satu pita DNA berukuran 276 bp dan alel A2 yang menghasilkan dua pita DNA berukuran 204 bp dan 72 bp (Gambar 1 dan Tabel 1). Hal ini karena alel A2 memiliki situs pengenalan restriksi *Bgl*II (A'GATC_T) dan sisi pemotongan pada basa ke-204, sedangkan alel A1 tidak memiliki situs pengenalan restriksi *Bgl*II. Alel A1 memiliki frekuensi alel lebih tinggi dibandingkan alel A2 karena memiliki persentase kehadiran fragmen 82,53% dari 17 sekuen pada NCBI PopSet 1817659977



Gambar 2. Elektroforegram hasil restriksi dengan enzim *Taq*I secara *in silico*.

Kiri : Ladder Life 1 kb plus : MN207281.1, MN207282.1, MN207283.1, MN207284.1, MN207285.1, MN207286.1, MN207287.1, MN207288.1, MN207289.1, MN207290.1;

Kanan : Ladder Life 1 kb plus : MN207291.1, MN207292.1, MN207293.1, MN207294.1, MN207295.1, MN207296.1, MN207297.1.

Restriksi dengan enzim *TaqI* pada pada 17 DNA gen *OMP* bakteri *Salmonella enterica* menghasilkan dua variasi alel, yaitu alel B1 yang menghasilkan satu pita DNA berukuran 276 bp dan alel B2 yang menghasilkan dua pita DNA berukuran 124 bp dan 152 bp (Gambar 2 dan Tabel 1). Hal ini karena alel B2 memiliki situs pengenalan restriksi *TaqI* (T'CG_A) dan sisi pemotongan pada basa ke-124, sedangkan alel B1 tidak memiliki situs pengenalan restriksi *TaqI*. Alel B1 memiliki frekuensi alel lebih tinggi dibandingkan alel B2 karena memiliki persentase kehadiran fragmen 94.11% dari 17 sekuen pada NCBI PopSet 1817659977.

Tabel 1. Frekuensi Alel *OMP* bakteri *Salmonella enterica* Berdasarkan Hasil RFLP *In Silico*

Enzim Restriksi	Situs Pengenalan Restriksi	Ukuran Fragment (bp)	Alel	Jumlah Kehadiran Fragment (N = 17)	Persentase Kehadiran Fragment (%)	Frekuensi Alel
<i>BglII</i>	A'GATC_T	276	A1	14	82.53%	0.8253
		204 dan 72	A2	3	17.64%	0.1764
<i>TaqI</i>	T'CG_A	276	B1	16	94.11%	0.9411
		124 dan 152	B2	1	5.89%	0.0589

Berdasarkan hasil RFLP *in silico* diketahui terdapat variasi genetik dalam sisi pengenalan restriksi enzim *BglII* dan *TaqI* pada sekuen DNA gen *OMP* yang diisolasi dan diamplifikasi dari kultur sel 17 isolat bakteri *Salmonella enterica* oleh Le, H. Q. *et al.* (2019) di Animal Cell Biotechnology, Institute of Biotechnology, Hanoi, Vietnam.

Variasi genetik adalah variasi yang terjadi pada genom suatu organisme baik pada basa nukleotida, gen ataupun kromosom. Variasi genetik pada tingkat dasar ditunjukkan oleh perbedaan pada urutan basa nukleotida (adenin, timin, guanin dan sitosin) yang membentuk DNA di dalam sel. Sumber terjadinya variasi genetik antara lain, mutasi, migrasi dan rekombinasi (Griffiths *et al.*, 2000). Mutasi merupakan perubahan pada urutan DNA sel genom dan diakibatkan oleh radiasi, virus, transposon, bahan kimia mutagenik, serta kesalahan selama proses meiosis ataupun replikasi DNA. Migrasi merupakan perpindahan makhluk hidup dari suatu tempat menuju tempat yang lainnya. Migrasi akan mengakibatkan terjadinya aliran genetik. Rekombinasi merupakan proses pemutusan seunting bahan genetika (biasanya DNA, namun juga bisa RNA) yang kemudian diikuti oleh penggabungan dengan molekul DNA lainnya. Pada eukariota rekombinasi biasanya terjadi selama meiosis sebagai pindah silang kromosom antara kromosom yang berpasangan. Proses ini menyebabkan keturunan suatu makhluk hidup memiliki kombinasi gen yang berbeda dari orang tuanya, dan dapat menghasilkan alel kimerik yang baru.

4. Kesimpulan

Hasil RFLP in silico pada penelitian ini menunjukkan adanya variasi genetik dalam sisi pengenalan restriksi enzim *Bgl*II (alel A1 dan alel A2) dan *Taq*I (alel B1 dan alel B2) pada 17 sekuen DNA gen *OMP* bakteri *Salmonella enterica* NCBI PopSet 1817659977.

DAFTAR PUSTAKA

- Bonang, G., Koeswardono, E, S., 1982, *Mikrobiologi Kedokteran Untuk Laboratorium Dan Klinik, Edisi I*. Jakarta : Gramedia
- Brooks, G.F., Janet, S.B., Stephen A.M. 2005. *Mikrobiologi Kedokteran (Medical Microbiology) buku I*. Jakarta: Salemba medika.
- Dai S, Long Y. 2015. Genotyping analysis using an RFLP assay. *Methods Mol Biol*. 1245:91-9.
- Griffiths, Anthony JF et al. 2000. *An Introduction to Genetic Analysis, 7th edition*. New York : W.H. Freeman
- Harjono, S. 2013. SINTESIS DAN UJI AKTIVITAS ANTIKANKER SENYAWA 1-(2-KLOROBENZOILOKSI) UREA DAN 1-(4-KLOROBENZOILOKSI)UREA. *Berkala Ilmiah Kimia Farmasi*, Vol.2 No. 1.
- Indrawan, M. et al. 2007. *Biologi konservasi*. Edisi revisi. Yayasan obor Indonesia. Jakarta
- Le,H.Q., Chu,T.T.H., Dao,T.T., Ha,H.T.T., Dang,S.T., Truong,D.T.Q., Tran,N.T. and Truong,G.T.H. *Salmonella enterica subsp. enterica outer membrane protein (omp) gene, partial cds*. URL : [Salmonella enterica subsp. enterica outer membrane protein \(omp\) gene, - PopSet - NCBI \(nih.gov\)](https://pub.ncbi.nlm.nih.gov/entry/info/Salmonella_enterica_subsp._enterica_outer_membrane_protein_(omp)_gene,-_PopSet_-_NCBI_(nih.gov)/). Diakses 25 Mei 2021.
- Nie, D., Hu, Y., Chen, Z., Li, M., Hou, Z., Luo, X., Mao, X., & Xue, X. (2020). Outer membrane protein A (OmpA) as a potential therapeutic target for *Acinetobacter baumannii* infection. *Journal of Biomedical Science*, 27(1), 1–8.
- Reddy, A., Prakash,V., dan Shiveji ,S. 2007. A Rapid, Non Invasive, PCR-Based Method for identification of Sex of The Endangered Old Word Vultures Implications for Captive Breeding Programmes. *Current Science*. 92(5).
- Siti, H. et al. 2013. *Variasi Urutan Nukleotida Daerah D-Loop DNA Mitokondria Manusia pada Dua Populasi Asli Indonesia Tenggara*. P.440-446.
- Sudarsono. 2005. *Taksonomi Tumbuhan tingkat tinggi*. Malang : Universitas Negeri Malang.
- Suryanto, D. 2003. *Melihat Keanekaragaman Organisme Melalui Beberapa Teknik Genetika Molekuler*. Sumatera utara : USU digital library.
- Theodore, G. Schurr. 2000. *Mitochondrial DNA and the Peopling of the New World Genetic variations among Native Americans provide further clues to who first populated the Americas and when they arrived*. American Scientist Online (The Magazine of Sigma XI, The Scientific Research Society).