

**KLONING OPEN READING FRAME GEN PENYANDI SERRALYSIN
DARI CANDIDATUS LIBERIBACTER ASIATICUS
PATOGEN HUANGLONGBING PADA TANAMAN JERUK**

Ai Astuti

17/419961/PMU/09172

INTISARI

Huanglongbing (HLB) merupakan penyakit utama yang menyerang tanaman jeruk disebabkan oleh bakteri *Candidatus Liberibacter asiaticus* (CLAs). Sifat pathogenesis bakteri CLAs diduga disebabkan oleh adanya protein serralysin. Serralysin merupakan salah satu protein yang telah banyak diteliti pada bakteri kelompok gram negatif dan berasosiasi dengan sifat virulensi dalam berbagai jenis infeksi. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui apakah ORF gen penyandi serralysin dari CLAs dapat dikloning. 111 daun jeruk bergejala HLB dikumpulkan dari beberapa daerah di Indonesia dan dideteksi menggunakan PCR dengan primer spesifik HLB Las606/LSS. 40 sampel positif HLB di PCR menggunakan primer SeraF/SeraR yang mengamplifikasi sebagian ORF gen penyandi serralysin dan ditemukan 14 sampel positif. 14 sampel positif di PCR lagi dengan primer FullSeraF/FullSeraR yang mengamplifikasi *full* ORF gen penyandi serralysin dan hanya 5 sampel positif. 1 sampel positif di sekuensing menggunakan metode *primer walking* dan hasil analisis BLAST diperoleh bahwa hasil sekuensing 100% homolog dengan serralysin dari beberapa strain bakteri CLAs. Kloning dilakukan dengan *pGEMT Easy Vector* dan ditransformasi dengan metode *heat shock* pada bakteri *E. coli* DH5alpha. Seleksi dilakukan dengan *White Blue Colony Selection* dengan 10 koloni berwarna putih. Plasmid diisolasi menggunakan *Presto™ Mini Plasmid Kit* dan dihasilkan di PCR dengan primer FullSeraF/FullSeraR. Koloni no 7 disekuensing untuk mengonfirmasi bahwa koloni tersebut membawa gen target. Hasil sekuensing menunjukkan bahwa koloni no 7 membawa ORF gen target dan hasil *alignment* menunjukkan bahwa sekuen ORF gen penyandi serralysin 100% homolog dengan sekuen serralysin dari data gene bank dengan *accession number* CP010804.1, CP029348.1, CP019958.1, AP014595.1, CP004005.1, dan CP001677.5. Kesimpulan dari penelitian ini bahwa ORF gen penyandi serralysin dari CLAs dapat dikloning pada *pGEMT Easy Vector*.

Kata kunci: *clas; huanglongbing; serralysin*

**CLONING OPEN READING FRAME OF SERRALYSIN-CODING GENE
FROM *CANDIDATUS LIBERIBACTER ASIATICUS*
THE PATHOGEN OF HUANGLONGBING ON CITRUS**

Ai Astuti

17/419961/PMU/09172

ABSTRACT

Huanglongbing (HLB) is the most destructive disease that attacks citrus plant caused by *Candidatus Liberibacter asiaticus* (CLAs). Pathogenicity of CLAs is guessed brought by protein of serralysin. Serralysin is one of the proteins belong to *superfamily RTX-Toxin*. Detection of serralysin was studied more in gram negative bacteria and associated with virulence factor in some kind of infection. The aims of this study is to understanding whether serralysin-coding gene could be cloned. The number of 111 HLB symptomatic citrus leaf samples were collected from some areas in Indonesia and detected by PCR using HLB specific primers Las606/LSS and found 40 HLB positive samples. PCR using primer SeraF/SeraR that amplified partial ORF serralysin coding gene was performed and the number of 14 out of 40 HLB samples were successfully amplified, whereas only 5 samples were amplified for the full ORF of serralysin-coding gene using primer FullSeraF/FullSeraR. The PCR product of one amplified sample was sequenced using primer walking for further confirmation and the results suggested that the amplified sequence was belong to serralysin coding-gene of CLAs with the homology of 99% to some strain of CLAs. Cloning on 1 sample was done using *pGEMT Easy Vector* and transformed in to *E. coli* DH5alpha using heat shock method and selected using white blue colony selection with 10 white colonies. Plasmid isolation using Presto™ Mini Plasmid Kit and PCR was performed using primer FullSeraF/FullSeraR. Colony number 7 and 8 was selected for sequencing and the result suggested the amplified DNA of colony number 7 was belong to serralysin coding like-gene of CLAs with the homology of 100% to the GeneBank accession numbers of CP029348.1, CP019958.1, CP010804.1, AP014595.1, CP004005.1, and CP001677.5. The conclusion of this study was ORF of serralysin coding gene could be cloned successfully in to *pGEMT Easy Vector*.

Keywords: *clas; huanglongbing; serralysin*