

## Desain Primer *Polymerase Chain Reaction* (PCR) secara In Silico untuk Amplifikasi Gen *gyrA Extensively Drug Resistant Tuberculosis* (XDR-TB)

Yunita Messe\*, I Made Budiarsa, & Abd Hakim Laenggeng

Program Studi Pendidikan Biologi, Universitas Tadulako, Indonesia

Received: 15 Juni 2020; Accepted: 20 Agustus 2020; Published: 5 Desember 2020

### ABSTRAK

Perubahan asam amino di area pengikatan fluorokuinolon pada gen *gyrA Mycobacterium tuberculosis* menyebabkan penanganan dan pengendalian penyakit tuberkulosis menjadi semakin sulit. Teknik PCR dapat dipergunakan untuk mendeteksi adanya resistensi terhadap obat fluorokuinolon dan keberhasilan cara ini tergantung pada primer yang digunakan. Penelitian ini bertujuan untuk mendesain kandidat primer gen *gyrA XDR-TB* secara *in silico*. Data yang digunakan dalam penelitian ini diperoleh melalui pencarian dalam situs *GeneBank* NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Desain primer ini dilakukan dengan menggunakan beberapa *software* dan situs bioinformatika, seperti *software* BioEdit versi 7.2.6, FastPCR 6.6 dan OligoAnalyzer (<https://sg.idtdna.com/calc/analyzer>). Studi ini berhasil mendesain sepasang kandidat primer dengan suhu  $T_m$  57,8°C dan telah memenuhi karakter primer yang baik yaitu primer-*forward* (5'-AACATTGAGGACCAGTCTAGCGA-3') memiliki panjang 23 bp dan GC content 47,8%, sedangkan primer-*reverse* (5'-CCAGCAGATAGGTGCCTTCAC-3') dengan panjang 21 bp dan GC content 57,1% serta terdapat peluang terbentuknya *self-dimer* sebanyak 1 bentuk.

**Kata Kunci:** Tuberkulosis; Gen *gyrA*; Desain primer

## Design of In Polymerase Chain Reaction (PCR) Primer Silico for Extensively *gyrA* Gene Amplification Drug Resistant Tuberculosis (XDR-TB)

### ABSTRACT

Changes in amino acids in the fluoroquinolone binding site in the *Mycobacterium tuberculosis gyrA* gene make the treatment and control of tuberculosis more difficult. PCR technique can be used to detect the presence of resistance to fluoroquinolone drugs and the success of this method depends on the primer used. The aim of this study was to design a primary candidate for the XDR-TB *gyrA* gene in silico. The data used in this study were obtained through a search on the NCBI GeneBank website (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>). This primer design was carried out using several bioinformatics software and websites, such as BioEdit software version 7.2.6, FastPCR 6.6 and OligoAnalyzer (<https://sg.idtdna.com/calc/analyzer>). This study succeeded in designing a pair of primer candidates with a  $T_m$  temperature of 57.8°C and has met good primary characters, namely primer-*forward* (5'-AACATTGAGGACCAGTCTAGCGA-3') has a length of 23 bp and a GC content of 47.8%, while the primer-*reverse* (5'-CCAGCAGATAGGTGCCTTCAC-3') with a length of 21 bp and a GC content of 57.1% and there is a chance for the formation of a self-dimer of 1 form.

**Keywords:** Tuberculosis; *gyrA* gene; Primary design

Copyright © 2020 Yunita Messe, I Made Budiarsa, & Abd Hakim Laenggeng

OPEN ACCESS



**Corresponding author:** Yunita Messe, Program Studi Pendidikan Biologi, Universitas Tadulako, Indonesia.

Email: [a22114017@gmail.com](mailto:a22114017@gmail.com)

## PENDAHULUAN

Tuberkulosis (TB) termasuk dalam 10 besar penyakit yang menyebabkan kematian di dunia. Data WHO menunjukkan bahwa pada tahun 2015, Indonesia termasuk dalam 6 besar negara dengan kasus baru TB terbanyak (*World Health Organisation*, 2017). *World Health Organisation* (2018), melaporkan bahwa pada tahun 2016, sekitar 6,3 juta kasus TB baru dilaporkan, hasil ini naik dari 6,1 juta pada tahun 2015 dan tercatat bahwa terdapat lima negara dengan jumlah kasus TB terbanyak di dunia yaitu India, Indonesia, Cina, Filipina dan Pakistan, yang bersama-sama menyumbang 56% dari total global. Dari jumlah tersebut, India, Indonesia dan Cina menyumbang 45% dari kasus global pada tahun 2016.

Pengobatan tuberkulosis menggunakan kombinasi beberapa obat antibiotik, yang lebih lanjut dikenal dengan sebutan OAT (Obat Anti Tuberkulosis). Penanganan dan pengendalian penyakit ini menjadi semakin sulit dengan meningkatnya kasus resistensi TB terhadap OAT. Resistensi OAT ini disebabkan oleh mutasi kromosomal terhadap masing-masing OAT (Aditama et al, 1995).

XDR-TB atau *Extensively Drug Resistant Tuberculosis* adalah bentuk kasus TB yang resistan terhadap setidaknya empat obat anti tuberkulosis inti. XDR-TB melibatkan resistensi terhadap OAT yang paling kuat, isoniazid dan rifampisin, atau biasa dikenal dengan MDR-TB, disertai resistensi terhadap salah satu obat lini kedua, golongan fluorokuinolon (seperti levofloxacin, siprofloksacin atau moxifloksacin) dan setidaknya resisten terhadap salah satu dari tiga obat lini kedua suntik (amikacin, capreomycin atau kanamycin) (Soepandi, 2010). Gen *gyrA* (DNA *gyrase subunit A*) merupakan salah satu gen pada *Mycobacterium tuberculosis* yang berperan dalam sebagian besar resistensi terhadap fluorokuinolon (Rinanda, 2015).

Mutasi pada fragmen gen dapat diidentifikasi dengan menggunakan teknik PCR (*Polymerase Chain Reaction*). Keberhasilan amplifikasi DNA pada metode PCR sangat tergantung pada ketepatan primer yang digunakan. Primer adalah nukleotida pendek berukuran 18-30 basa yang diperlukan sebagai titik pelekatan enzim DNA polimerase pada proses pembentukan atau pemanjangan DNA suatu gen spesifik secara

*in vitro* melalui teknik reaksi rantai polimerisasi (PCR) (Handoyo & Rudiretna, 2001).

Sepasang primer harus memiliki karakter yang baik agar dapat menempel pada gen target (Handoyo & Rudiretna, 2001). Pemenuhan syarat katakter primer yang baik tersebut memerlukan kalkulasi matematis yang secara bersamaan dapat dilakukan dengan menggunakan program maupun *software* bioinformatika pada proses desain primer. Melihat keterbatasan data mengenai desain primer gen *gyrA* XDR-TB, maka metode *in silico* PCR dapat membantu menggali informasi mengenai identifikasi mutasi gen *gyrA* pada kasus XDR-TB.

Penelitian tentang desain primer secara *in silico* gen penyebab MDR-TB sudah pernah dilakukan yakni untuk resistensi terhadap rifampisin pada gen *rpoB* diteliti oleh Pradnyanti (2013), resistensi terhadap isoniazid pada gen *katG* diteliti oleh Suryadi (2014) dan gen *inhA* diteliti oleh Maitriani (2015). Namun, pada kasus XDR-TB belum pernah dibuatkan desain primer gen penyebab resistensi terhadap fluorokuinolon atau pada gen *gyrA*.

Berdasarkan latar belakang yang telah dijelaskan di atas, maka peneliti tertarik untuk melakukan penelitian desain primer PCR secara *in silico* untuk amplifikasi gen *gyrA* (DNA *gyrase subunit A*) XDR-TB.

## METODE

Data sekuens gen *gyrA* yang digunakan dalam penelitian ini terdiri dari 15 strain bakteri *Mycobacterium tuberculosis* yang diunduh dari *genbank* NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>) dengan kode *genbank* CP025596.1, CP020381.2, JLK601000001.1, CP016794.1, CP009101.1, AP017901.1, AP018036.1, JX303253.1, CP010873.1, CP009187.1, CP018778.1, CP010968.1, LHCK01000004.1, LWDQ01000001.1, MG995185.1. File sekuens yang dipilih berupa *full coding sequences (full cds)* karena berisi nukleotida-nukleotida hasil gabungan dari bagian ekson atau wilayah sebenarnya dari DNA yang diterjemahkan untuk membentuk protein (Furuno et al, 2003). Selanjutnya informasi sekuens gen diunduh dalam format FASTA dengan membuka masing-masing kode akses setiap sekuens pada situs NCBI.

*Multiple Sequence Alignment* (MSA) dilakukan untuk menganalisis data sekuens gen *gyrA* yang telah diunduh, sehingga dengan cara ini dapat diketahui posisi *basepair* (bp) yang memiliki persamaan dan perbedaan urutan nukleotida pada sekuens gen *gyrA*. Informasi tersebut akan menunjukkan tingkat konservatif *basepair* pada gen yang nantinya dijadikan sebagai patokan pertimbangan dalam menentukan posisi penempelan primer (Kalendar et al, 2014). Proses *alignment* ini dilakukan dengan menggunakan *software BioEdit* versi 7.2.6 khususnya dengan algoritma ClustalW.

Desain kandidat primer dilakukan dengan menggunakan *software* FastPCR 6.6 dan memilih fitur ‘PCR Primer Design’. Kelebihan dari *software* ini yakni memiliki fitur *multiplex* PCR yang dapat memudahkan kita untuk menemukan kandidat primer dengan satu reaksi meskipun melakukan amplifikasi pada beberapa DNA target (Kalendar et al, 2011; Wu et al, 2007). Pada tahap ini diperoleh beberapa pasang kandidat primer yakni primer-*forward* dan primer-*reverse*.

Kandidat primer yang diperoleh selanjutnya diseleksi berdasarkan karakternya untuk memperoleh sepasang primer final (*forward* dan *reverse*) yang memiliki karakter primer yang baik. Adapun karakter tersebut yaitu panjang primer, GC content, Tm, Hairpin, Cross-Dimer dan Self-Dimer (Sasmito et al, 2014). Pengecekan karakter primer ini dilakukan dengan menggunakan situs *online* yaitu *OligoAnalyzer* (sg.idtdna.com/calc/analyzer).

Setelah didapatkan primer yang diinginkan, kemudian dilakukan uji *in silico* PCR untuk mendapatkan gambaran proses amplifikasi yang terjadi, seperti dapat diketahui titik penempelan primer yang diprediksi dapat memunculkan daerah yang dapat diamplifikasi dan akan memunculkan besar ampikon yang terbentuk. Analisis ini dilakukan dengan menggunakan

*software* FastPCR 6.6 dengan memilih fitur ‘*in silico* PCR’.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil analisis *multiple sequence alignment* dengan algoritma ClustalW menunjukkan pada sekuens gen *gyrA* dari 15 strain bakteri *Mycobacterium tuberculosis* terdapat variasi susunan basa pada nukleotida dan terjadi perbedaan pada posisi basa nomor 258 bp, 269 bp, 280 bp, 281 bp, 591 bp dan 1646 bp. Pada basa nomor 258 bp terjadi perubahan basa (G→A), 269 bp (C→T), 280 bp (G→A), 281 bp, (A→G), 591 bp (G→A), dan 1646 bp (T→Y). Keenam variasi susunan basa nukleotida ini termasuk kedalam tipe transversi, yaitu substitusi basa purin dengan pirimidin atau sebaliknya (Aisyah et al, 2015). Hasil ini mengindikasikan bahwa posisi basa ini rentan mengalami mutasi, maka dari itu dalam penentuan posisi primer sebaiknya tidak mengenai posisi basa tersebut.

Desain primer ini menghasilkan 5 macam pasang kandidat primer (*forward* dan *reverse*) yang tercantum dalam Tabel 1. Setiap hasil desain primer yang dikeluarkan oleh *software* FastPCR 6.6 selalu terdapat kandidat pasangan primer *forward* dan *reverse* yang direkomendasikan. Primer *forward* merupakan primer dengan arah sintesis maju (5’→3’) sedangkan *reverse* merupakan primer dengan arah sintesis terbalik (3’→5’). Primer ini nanti akan berfungsi sebagai pembatas fragmen DNA target yang ingin diamplifikasi (Handoyo & Rudiretna, 2001). Kandidat primer ini diberi penamaan khusus agar memudahkan dalam mengenali setiap primer. Primer *forward* diberi simbol huruf “F”, sedangkan primer *reverse* disimbolkan dengan huruf “R” dan kemudian dilanjutkan dengan nomor angka sesuai urutan kandidat primer.

Tabel 1. Kandidat primer (*forward* dan *reverse*)

Kandiadat	Primer	Panjang Primer (bp)	Tm (°C)	GC%	Uji Hairpin	Uji Self-Dimer	Uji Cross-Dimer
1.	F1: (5'-CAAGACCGATCTGTATCGCAGC-3')	22	57,8	54,5	-	1	2
	R1: (5'-CCAGCAGATAGGTGCCTTCAC-3')	21	57,8	57,1	-	1	
2.	F2: (5'-AACATTGAGGACCAGTCTAGCGA-3')	23	57,8	47,8	-	-	-
	R2: (5'-CCAGCAGATAGGTGCCTTCAC-3')	21	57,8	57,1	-	1	
3.	F3: (5'-AACATTGAGGACCAGTCTAGCGA-3')	23	57,8	47,8	-	-	1
	R3: (5'-ACTGCATGTCCAGGATTGCCT-3')	21	59,2	52,4	-	3	

4.	F4: (5'-CAAGACCGATCTGTATCGCAGC-3')	22	57,8	54,5	-	1	2
	R4: (5'-CGAAGTCGGTCAGCTTGGACT-3')	21	59,2	51,7	-	2	
5.	F5: (5'-GGGTGCTCTATGCAATGTTCTGA-3')	22	57,5	50	-	3	3
	R5: (5'-CCAGCAGATAGGTGCCTTCAC-3')	21	57,8	57,1	-	1	

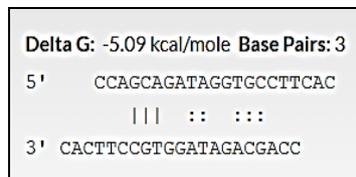
Kandidat pasangan primer *forward* dan *reverse* yang terbaik adalah primer yang memenuhi kriteria-kriteria dari desain primer. Pada kandidat pasangan primer kedua, primer *forward* F2: 5'-AACATTGAGGACCAGTCTAGCGA-3' dengan primer *reverse* R2: 5'-CCAGCAGATAGGTGCCTTCAC-3' memenuhi kriteria panjang primer, suhu Tm yang sama, GC

*content* serta memiliki total uji *hairpin*, total uji *self-dimer* dan total uji *cross-dimer* yang lebih rendah dari kandidat primer yang lainnya, tercantum dalam Tabel 2. Total uji struktur sekunder dari pasangan primer diperoleh bahwa primer *reverse* (R2) terdapat peluang *self-dimer* sebanyak 1 bentuk yang tampak pada Gambar 1.

Tabel 2. Pasangan primer gen *gyra* hasil kombinasi yang memenuhi kriteria desain primer

Karakter Primer	F2*	R2*	Acuan Karakter Primer
Panjang Primer (bp)	23	21	18-30
Tm (°C)	57,8	57,8	52-58
GC %	47,8	57,1	45-60
Total Uji Hairpin	-	-	-
Total Uji Self-Dimer	-	1	-
Total Uji Cross-Dimer	-	-	-

Catatan : F2: (5'-AACATTGAGGACCAGTCTAGCGA-3')  
R2: (5'-CCAGCAGATAGGTGCCTTCAC-3')



Gambar 1. Posisi *self-dimer* dari primer-*reverse* (R2).

```

In silico Primer(s) search for: ap017901.1 "strain: ncm946k2"
1 5'-aacattgaggaccagctctagcga
Position: 901->923 1 0°C
5-aacattgaggaccagctctagcga->
|||||
ccacattgaggaccagctctagcgaatgg
2 5'-ccagcagataggtgccttcac
Position: 2153<-2173 1 2°C
<-cacttccgtggatagacgacc-5
|||||
ggtgagggcaccctatctgctggtggc
>1 901->923
5'-aacattgaggaccagctctagcga
>2 2153<-2173
5'-ccagcagataggtgccttcac
PCR product size: 1273bp Ta=64°C

```

Gambar 2. Hasil Analisis PCR *In Silico* Menggunakan FastPCR.

Setelah didapatkan primer yang diinginkan, kemudian dilakukan uji *in silico* PCR dengan menggunakan *software* FastPCR 6.6 untuk mendapatkan gambaran amplifikasi yang terjadi dengan menggunakan primer tersebut atau untuk mengetahui penempelan primer pada gen target. Hasil penelitian menunjukkan bahwa primer

*forward* dan *reverse* (F2 dan R2) dapat menempel di seluruh sekuen strain bakteri. Secara keseluruhan, primer-*forward* menempel pada posisi 901-923 bp, sedangkan primer *reverse* menempel pada posisi 2153-2173 bp. Dengan demikian maka dapat diketahui bahwa panjang produk PCR (amplikon) yang terbentuk yakni



*dimer* nya nol, sedangkan untuk primer *reverse* uji *hairpin*-nya nol dan terdapat peluang *self-dimer* sebanyak 1 bentuk tampak pada Gambar 1. *Self dimer* terbentuk oleh interaksi intermolekuler antara dua molekul primer yang sama, dimana primer homolog terhadap dirinya sendiri (Sasmito et al, 2014).

Primer *forward* dan *reverse* yang telah dihasilkan selanjutnya diuji spesifitas primer pada template menggunakan BLAST-NCBI. Hasil BLAST menunjukkan bahwa sepasang primer yang dihasilkan benar-benar unik atau spesifik pada bakteri *Mycobacterium tuberculosis*. Menurut Madden (2013), Penelusuran BLAST (BLAST *search*) pada basis data sekuens memungkinkan ilmuwan untuk mencari sekuens asam nukleat yang mirip dengan sekuens tertentu yang dimilikinya. Hal ini berguna misalnya untuk menemukan urutan nukleotida sejenis pada beberapa organisme atau untuk memeriksa keabsahan hasil desain primer maupun untuk memeriksa fungsi urutan nukleotida hasil *sekuensing*. Algoritma yang mendasari kerja BLAST adalah penyejajaran sekuens.

### KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan, maka dapat diambil kesimpulan bahwa studi ini berhasil mendesain sepasang kandidat primer dengan suhu  $T_m$  57,8°C dan telah memenuhi karakter primer yang baik yaitu primer-*forward* (5'-AACATTGAGGACCAGTC TAGCGA-3') memiliki panjang 23 bp dan GC content 47,8%, sedangkan primer-*reverse* (5'-CCAGCAGATAGGTGCCTTAC-3') dengan panjang 21 bp dan GC content 57,1% serta terdapat peluang terbentuknya *self-dimer* sebanyak 1 bentuk.

### DAFTAR PUSTAKA

Aditama TY, Chairil AS, Herry BW. 1995. Resistensi Primer dan Sekunder Mikobakterium Tuberkulosis. *Jurnal Cermin Dunia Kedokteran*: 101, 48-49.

Aisyah I, Kurniadi E, Carnia E, Ula N. 2015. Representasi Mutasi Kode Genetik Standar Berdasarkan Basa Nukleotida. *Jurnal Matematika Integratif* 11: 25-34.

Elsalam KAA. 2003. Bioinformatic Tools and Guideline for PCR Primer Design. *African Journal of Biotechnology* 2: 91-95.

Furuno M, Kasukawa T, Saito R, Adachi J, Suzuki H, Baldarelli R, Hayashizaki Y, Okazaki Y. 2003. CDS Annotation in Full-Length cDNA Sequence. *Genome Research* 13: 1478-1487.

Handoyo D, Rudiretna A. 2001. Prinsip Umum dan Pelaksanaan Polymerase Chain Reacion (PCR). *Pusat Studi Bioteknologi Universitas Surabaya* 9: 17-29.

Judelson H. 2011. Guidelines for Designing Primers. [Online]. Tersedia: <https://oomyceteworld.net/protocols/primer%20designing2.pdf> [19 April 2018].

Kalendar R, Lee D, Schulman AH. 2011. Java Web Tools for PCR, In Silico PCR, and Oligonucleotide Assembly and Analysis. *Genomics* 98: 137-144.

Kalendar R, Lee D, Schulman AH. 2014. FastPCR Software for PCR, In Silico PCR, and Oligonucleotide Assembly and Analysis. *DNA Cloning and Assembly Methods, Methods in Molecular Biology Series* 1116: 271-302.

Madden T. 2013. The BLAST Sequence Analysis Tool. [Online]. Tersedia: <https://pdfs.semanticscholar.org/54d1/66e6e6e7414f37c298cb9e9b2aba58b24eaa.pdf> [11 April 2018].

Maitriani LKB, Wirajana IN, Yowani SC. 2015. Desain Primer untuk Amplifikasi Fragmen Gen *inhA* Isolat 134 *Multidrug Resistance Tuberculosis* (MDR-TB) dengan Metode Polymerase Chain Reaction. *Cakra Kimia* 3: 89-96.

Pradnyaniti DG, Wirajana IN, Yowani SC. 2013. Desain Primer Secara In Silico untuk Amplifikasi Fragmen Gen *rpoB* *Mycobacterium tuberculosis* dengan Polymerase Chain Reaction (PCR). *Jurnal Farmasi Udayana* 8: 1-7.

Rinanda T. 2015. Kajian Molekuler Mekanisme Resistensi *Mycobacterium Tuberculosis*. *Jurnal Kedokteran Syiah Kuala* 15: 162-167.

Sasmito DEK, Kurniawan R, Muhimmah I. 2014. Karakteristik Primer pada Polymerase Chain Reaction (PCR) untuk Sekuensing DNA. Mini Review pada Seminar Nasional

- Informatika Medis (SNIMed) V. Universitas Islam Indonesia, Yogyakarta.
- Soepandi PZ. 2010. "Diagnosis dan Faktor yang Mempengaruhi Terjadinya MDR-TB". *Jurnal Tuberkulosis Indonesia* 7: 16-19.
- Suryadi PT, Ratnayani K, Yowani SC. 2014. "Desain Primer untuk Amplifikasi Gen *katG* Multidrug Resistance Tuberculosis (MDR-TB) dengan Metode Polymerase Chain Reaction (PCR)". *Jurnal Kimia* 8: 77-82.
- World Health Organisation. 2017. *Global Tuberculosis Report 2017*. WHO, France.
- World Health Organisation. 2018. *Tuberculosis (TB): Drug-resistant TB: XDR-TB FAQ*. [Online]. Tersedia: <http://www.who.int/tb/areas-of-work/drug-resistant-tb/xdr-tb-faq/en/> [05 April 2018].
- Wu LC, Horng JT, Huang HY, Lin FM, Huang HD, Tsai MG. 2007. "Primer Design for Multiplex PCR Using a Genetic Algorithm". *Soft Comput* 11: 855–863.