

**DESAIN PRIMER UNTUK AMPLIFIKASI GEN *katG* MULTIDRUG RESISTANCE
TUBERCULOSIS (MDR-TB) DENGAN METODE POLYMERASE CHAIN REACTION (PCR)**

Putu Tedi Suryadi^{1)*}, Ketut Ratnayani²⁾³⁾, dan Sagung Chandra Yowani¹⁾³⁾

¹⁾*Jurusan Farmasi, F.MIPA, Universitas Udayana, Bukit Jimbaran*

²⁾*Jurusan Kimia, F.MIPA, Universitas Udayana, Bukit Jimbaran*

³⁾*Kelompok Studi MDR dan XDR Tuberculosis*

**Email: tedisuryadits@gmail.com*

ABSTRAK

Tuberkulosis, penyakit utama di dunia, merupakan salah satu penyakit infeksi yang mewabah. Permasalahan makin rumit dan diperberat dengan adanya strain *Mycobacterium tuberculosis* yang resisten terhadap obat anti tuberkulosis (OAT), seperti isoniazid (INH). Mutasi pada gen *katG* adalah mekanisme utama penyebab resistensi INH pada sebagian besar strain. Amplifikasi DNA pada gen *katG* *Mycobacterium tuberculosis* dilakukan dengan metode PCR untuk mendeteksi adanya mutasi. Sepasang primer yang spesifik (forward dan reverse) merupakan faktor terpenting untuk membatasi daerah target yang akan diamplifikasi. Pendesainan primer dilakukan untuk menghasilkan primer spesifik yang diinginkan. Penelitian ini bertujuan mendesain primer spesifik untuk mengamplifikasi fragmen target pada gen *katG*. Desain primer secara *in silico* menggunakan *Clone Manager Suite 6*. Sekuen DNA yang digunakan sebagai templat dalam penelitian desain primer ini diunduh dari situs www.ncbi.nlm.nih.gov. Gen *katG* *M. tuberculosis* H37Rv dengan kode genbank : X68081.1 yang dipilih sebagai templat. Studi ini berhasil mendesain primer *forward* (5' GAAGTACGGCAAGAAGCTCTC 3') dan *reverse* (5' CGTGATCCGCTCATAGATCG 3') dengan panjang primer masing-masing 21 dan 20 nukleotida. Sepasang primer ini telah memenuhi persyaratan primer yang baik yaitu panjang primer, nilai Tm, persentase kandungan GC, tanpa hairpins, keterbatasan adanya *dimers* dan *runs*. Kesimpulan penelitian ini telah memperlihatkan bahwa primer yang telah berhasil didesain secara *in silico*, dengan tepat mampu mengamplifikasi fragmen gen *katG* sebesar 724 pb.

Kata kunci: Desain primer, PCR, Gen *katG* *Mycobacterium tuberculosis*, *in silico*, *Clone Manager Suite 6*

ABSTRACT

Tuberculosis, the world's major diseases, is one of the emerging infectious disease. The tuberculosis problem has become complicated and burdensome due to the emergence of drug resistant such as isoniazid (INH) resistant strains of *Mycobacterium tuberculosis*. Mutation in *katG* gene is the main mechanism of INH-resistance in most strains. Amplification of *M. tuberculosis katG* gene was performance by using PCR for detect the mutation. A pair of specific PCR primers (forward and reverse) was the most important factor to limit the target region of amplification. Primer designing is preceedly carried out for producing the specific primer desired. The aim of this study was to design the specific primers for a fragment of *katG* gene. In silico primer design was carried out by using *Clone Manager Suite 6*. DNA sequence template used in this primer design was downloaded from www.ncbi.nlm.nih.gov. *M. tuberculosis* H37Rv *katG* gene with genbank code X68081.1 was choosen. This study was successfully designed the forward primer (5' GAAGTACGGCAAGAAGCTCTC 3') and reverse one (5' CGTGATCCGCTCATAGATCG 3') which was length of 21 and 20 nucleotide, respectively. These pair of primers were meet the requirement of a good primer include primer length, Tm value, percentage of GC content, no hairpins, limited dimers and runs. In conclusion, the result of this research showed that the primer designed were acceptable to amplify the fragment of 724 bp of *katG* gene in silico.

Keywords: Primer Design, PCR, *katG* gene *Mycobacterium tuberculosis*, *in silico*, *Clone Manager Suite 6*

PENDAHULUAN

Saat ini tuberkulosis (TB), penyakit yang disebabkan oleh bakteri *Mycobacterium tuberculosis*, masih menjadi masalah kesehatan masyarakat di dunia terutama di negara berkembang. Indonesia menduduki peringkat keempat tertinggi di dunia dengan kasus TB setelah India, Cina dan Afrika Selatan (World Health Organization, 2011). Penanganan dan pengendalian penyakit ini menjadi semakin sulit dengan meningkatnya kasus resistensi TB terhadap obat anti tuberkulosis (OAT). Resistensi bakteri TB terhadap berbagai OAT setidaknya terhadap isoniazid dan rifampisin sudah dikategorikan sebagai kejadian *Multi-Drug Resistance Tuberculosis* atau MDR-TB (World Health Organization, 2010).

Isoniazid (INH) merupakan obat kemoterapi lini pertama untuk pengobatan TB. INH berupa *prodrug* yang akan diubah menjadi bentuk aktifnya oleh enzim katalase peroksidase yang dikode oleh gen *katG* pada *M. tuberculosis*. Maka apabila terjadi mutasi pada gen *katG* dapat menyebabkan *M. tuberculosis* menjadi resisten terhadap INH (Darwani, 2008).

Beberapa penelitian telah mendeteksi adanya mutasi pada gen *katG* yang berhubungan dengan resistensi terhadap INH dengan teknik PCR. Pada isolat resisten terhadap INH di Belarus telah adanya mutasi yang ditemukan pada kodon 305, 309, 315, 316 dan 321 (Bostanabad *et al*, 2008). Daerah mutasi tersebut digunakan sebagai daerah target dalam mendesain primer PCR yang akan dilakukan dalam penelitian ini dengan menerapkan suatu disiplin ilmu bioinformatika.

Bioinformatika merupakan bidang interdisipliner yang secara luas didefinisikan sebagai perpaduan antara ilmu biologi (biologi molekuler) dan komputasi dengan menggunakan bantuan komputer dan *software*. Salah satu peran paling signifikan dari bioinformatika adalah untuk merancang dan menghasilkan sekuens primer (Neel *et al*, 2010). Untuk mendapatkan suatu primer yang memenuhi kriteria primer yang baik untuk amplifikasi dilakukan desain secara *in silico*.

Penelitian ini merupakan bagian dari penelitian besar untuk mendeteksi adanya mutasi gen *katG* pada isolat MDR-TB. Tujuan khusus dari penelitian ini adalah untuk mendesain primer

spesifik yang akan digunakan dalam amplifikasi PCR sehingga mampu mengamplifikasi gen *katG* MDR-TB.

MATERI DAN METODE

Gen *katG* *M. tuberculosis* H37Rv

Sebagai cetakan untuk mendesain primer, digunakan gen *katG* *M. tuberculosis* H37Rv (kode genbank X68081.1) yang dapat diunduh pada situs www.ncbi.nlm.nih.gov.

Software dalam Desain Primer

Dalam penelitian ini primer didesain secara *in silico* dengan bantuan *software Clone Manager Suite 6* (University of Groningen). Daerah target yang digunakan yaitu dari 2437 sampai dengan 3160 pasang basa pada gen *katG* *M. tuberculosis* H37Rv.

Prosedur Kerja Software Clone Manager Suite 6

Untuk mendesain primer, langkah-langkah yang dilakukan adalah membuka program *Clone Manager Suite 6*, Pada ikon **File** klik **Molecule List...** lalu masukkan sekuens DNA *M. tuberculosis* gen *katG* pada program. Selanjutnya pada ikon **Primer** dipilih **Design...**, akan muncul menu **Design Primers** pada *menu bar*. Selanjutnya masukkan panjang primer dan daerah target yang diinginkan. Program ini akan memberikan beberapa pilihan primer serta hasil analisis yang dapat membantu untuk menentukan primer terbaik. Hasil analisis dapat dilihat dengan menggunakan pilihan *Primer Report*. Rentang daerah primer dan hasil analisis juga dapat dilihat dengan menggunakan pilihan **Primer** dan klik **Analyze Mix Wizard...**, dimana dimasukkan sekuens masing-masing primer dan sekuens gen *katG* *M. tuberculosis*.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Setelah memasukkan data sekuens gen *katG* *M. tuberculosis* H37Rv dari *database* NCBI pada URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> dengan

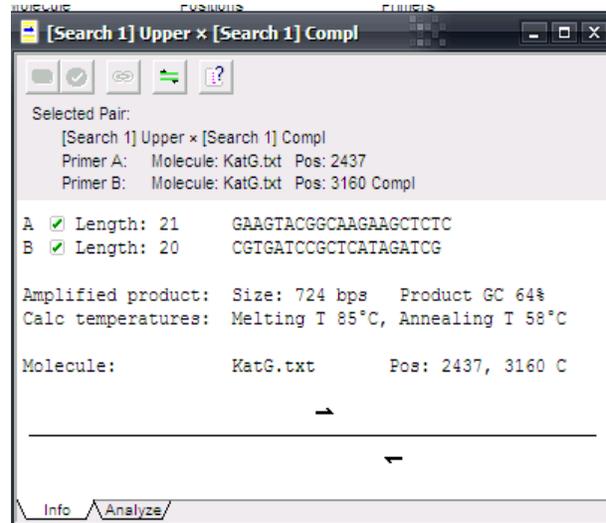
kode genbank : X68081.1 serta daerah target yang diinginkan, maka diperoleh 23 pasang primer yang ditawarkan oleh program *Clone Manager Suite 6*, seperti ditunjukkan pada Gambar 1. Dari 23 pasang primer tersebut, maka dipilih hanya satu pasang primer yang memenuhi kriteria terbaik.

Satu pasang primer yang dipilih dengan kriteria terbaik yaitu primer no 1 dengan daerah 2437-3160 pasang basa, seperti yang tertera pada Gambar 2.

Rank	Position A	Position B	GC % A	GC % B	Tm°C A	Tm°C B	Max Dimers 3' Any	FPrim A	FPrim B	Product Length
1	2437	3160	52	55	62	62	2 4	724
2	2422	3235	52	55	64	63	2 4	814
2	2424	3235	57	55	65	63	2 4	812
4	2424	3160	57	55	65	62	2 4	737
4	2422	3202	52	55	64	64	2 6	781
4	2437	3202	52	55	62	64	2 4	766
4	2437	3201	52	55	62	64	2 4	765
4	2437	3235	52	55	62	63	2 5	799
4	2422	3201	52	55	64	64	2 6	780
4	2441	3235	52	55	64	63	2 5	795
4	2422	3160	52	55	64	62	2 4	739
4	2441	3160	52	55	64	62	2 4	720
13	2418	3206	57	60	68	69	2 6	789
13	2424	3154	57	55	65	63	2 6	731
13	2437	3154	52	55	62	63	2 6	718
13	2422	3163	52	55	64	65	2 6	742
17	2418	3165	57	60	68	66	2 6	748
17	2418	3163	57	55	68	65	2 6	746
19	2418	3160	57	55	68	62	2 4	749
19	2418	3203	57	60	68	65	2 6	786
19	2418	3201	57	55	68	64	2 6	784
19	2418	3202	57	55	68	64	2 6	785
19	2418	3164	57	60	68	65	2 6	747

Gambar 1. Hasil Daerah Produk Primer yang Ditawarkan Oleh Program

Gambar 1 menunjukkan terdapat 23 pasang primer yang ditawarkan oleh program *Clone Manager Suite 6* yang memenuhi target yaitu membatasi gen *katG* yang akan diamplifikasi. Di antara ke 23 pasang primer tersebut, selanjutnya harus dipilih salah satu primer yang memenuhi kriteria terbaik dari segi nilai Tm yang dihasilkan. Sepasang primer seharusnya memiliki nilai Tm yang sama. Ketidaksamaan nilai Tm dalam sepasang primer dapat mengurangi efisiensi dan spesifitas proses *annealing* karena berpotensi menyebabkan *mispriming* (Dieffenbach *et al*, 1995). Sepasang primer yang dipilih tersebut adalah primer *forward* dengan sekuens 5' GAAGTACGGCAAGAAGCTCTC 3' (21 nukleotida) dan primer *reverse* dengan sekuens 5' CGTGATCCGCTCATAGATCG 3' (20 nukleotida) seperti tertera pada Gambar 2.



Gambar 2. Hasil Sekuens Primer yang Didesain dan Dipilih.

Pada Gambar 2 menunjukkan bahwa dari segi panjang primer, panjang primer yang dihasilkan sudah memenuhi kriteria primer yang baik. Panjang primer yang didesain sudah memenuhi kriteria panjang primer yang baik. Menurut Handoyo dan Ari, panjang primer yang baik adalah terdiri dari 18-30 nukleotida. Ukuran primer setidaknya 18 nukleotida, bila lebih pendek kemungkinan terjadinya *mispriming* (penempelan primer di tempat lain yang tidak diinginkan) akan menjadi tinggi. Hal ini dapat menyebabkan berkurangnya spesifitas primer yang akan berpengaruh pada efektifitas dan efisiensi proses PCR. Sedangkan untuk panjang primer yang lebih dari 30 nukleotida tidak akan meningkatkan spesifitas primer secara bermakna (Handoyo dan Ari, 2001).

Berikut kualitas sepasang primer yang telah didesain dan dipilih yang tertera pada Gambar 3.

Gambar 3 menunjukkan kriteria hasil primer yang telah didesain, masing-masing primer *forward* dan *reverse* memiliki nilai Tm yang sama yaitu 62°C. *Melting Temperature* (Tm) adalah temperatur dimana 50% untai ganda DNA terpisah (Handoyo dan Ari, 2001). Tm yang optimal untuk primer adalah 52°-58°C, secara umum akan mendapatkan hasil yang lebih baik dibandingkan primer dengan Tm yang lebih rendah. Primer dengan Tm diatas 65°C sebaiknya dihindari karena berpotensi terjadinya *annealing* sekunder (Borah,

2011). Primer dengan 50% GC *content* umumnya memiliki nilai Tm berkisar antara 56-62°C (Dieffenbach *et al.*, 1993). Sehingga dapat disimpulkan bahwa Tm masing-masing primer sudah memenuhi kriteria primer yang baik.

[Search 1] Upper x [Search 1] Compl
Primer Pair Report

Primer Summary:	-A-	-B-	Comment
Length	21	20	1 base difference
% GC	52	55	3 % difference
Tm °C	62	62	
3' Dimers	2	2	A:B 2
Dimers - Any	4	4	A:B 3
Stability (kcal)	2.4	1.8	
Runs of bases	2	2	
Repeats (dinuc)	2	none	
Hairpins	none	none	
False Priming °C	--	--	

Gambar 3. Kriteria Sepasang Primer yang Didesain.

menunjukkan bahwa *dimers* yang kemungkinan terjadi masih dalam batas toleran adanya *dimers*. *Dimers* terbentuk oleh adanya interaksi intermolekular antar primer. *Dimers* dapat memberikan pengaruh dalam proses amplifikasi (Borah, 2011).

[Search 1] Upper
PCR Primer: Rank 1 Pos: 2437 KatG.txt
One Primer Report

Criteria Used:	PCR Primer	This Primer	Meets Criteria
% GC	Range 50-60	52	Yes
Tm°C	Range 55-80	62	Yes
3' Dimers	< 3 matches 3'end	2	Yes
Dimers-Any	< 7 adj homol bases	4	Yes
Stability	>= 1.2 kcal 5'vs3'	2.4	Yes
Runs	< 3 base runs	2	Yes
Repeats	< 3 dinuc repeats	2	Yes
Hairpins	Annealing 55°C	none	Yes
Worst-case False Priming °C		--	

Gambar 4. Kriteria Primer *Forward*.

Adapun Gambar 4 dan Gambar 5 menunjukkan kualitas primer *forward* dan *reverse* secara terpisah.

Persentase GC (*GC content*) untuk primer *forward* yaitu 52 dan untuk primer *reverse* yaitu 55 seperti yang ditunjukkan pada Gambar 4 dan Gambar 5. Primer seharusnya memiliki persentase GC antara 40-60% (Borah, 2011; Wu *et al.*, 2007) untuk menghasilkan ikatan yang spesifik (Wu *et al.*, 2007).

Posisi ujung 3' sekuens primer penting untuk diperhatikan. Komplemen antar primer terutama pada posisi ujung 3'-nya dapat menimbulkan fenomena *primer-dimers* (Dieffenbach *et al.*, 1993). Urutan nukleotida pada ujung 3' sebaiknya G atau C. Nukleotida A atau T lebih toleran terhadap *mismatch* daripada G atau C, dengan demikian akan menurunkan spesifitas primer (Handoyo dan Ari, 2001). Ujung 3' primer *forward* dan *reverse* masing-masing adalah C dan G. Hal ini dapat menimbulkan *primer-dimers* seperti yang telah tertera pada Gambar 3. Namun dari hasil analisis untuk masing-masing primer yang tercantum pada Gambar 4 dan Gambar 5,

[Search 1] Compl
PCR Primer: Rank 1 Pos: 3160 C KatG.txt
One Primer Report

Criteria Used:	PCR Primer	This Primer	Meets Criteria
% GC	Range 50-60	55	Yes
Tm°C	Range 55-80	62	Yes
3' Dimers	< 3 matches 3'end	2	Yes
Dimers-Any	< 7 adj homol bases	4	Yes
Stability	>= 1.2 kcal 5'vs3'	1.8	Yes
Runs	< 3 base runs	2	Yes
Repeats	< 3 dinuc repeats	none	Yes
Hairpins	Annealing 55°C	none	Yes
Worst-case False Priming °C		--	

Gambar 5. Kriteria Primer *Reverse*.

Pada Gambar 4 dan Gambar 5 menunjukkan pula kriteria seperti *runs*, *repeats*, dan *hairpins* untuk masing-masing primer sudah sesuai dengan kriteria yang dipersyaratkan dalam program *Clone Manager Suite 6*. *Runs*, *repeats* dan *hairpins* merupakan kehadiran struktur sekunder yang dihasilkan oleh interaksi intermolekular dan

intramolekular yang dapat membawa efek buruk pada proses amplifikasi dan dapat mengurangi ketersediaan primer dalam reaksi (Borah, 2011).

Sesuai pada Gambar 3, sepasang primer yang telah didesain tidak terdapat *hairpins*. *Hairpins* dibentuk oleh interaksi intramolekular dalam primer. Hal ini harus dihindari. Kehadiran *hairpins* pada ujung 3' berefek buruk yaitu dapat mempengaruhi jumlah primer pada reaksi PCR sehingga berpengaruh pada efektifitas dan efisiensi proses PCR (Borah, 2011; Handoyo dan Ari, 2001).

Prod Len	Source Molecule	Primer Positions	Primers
724	KatG.txt	2437, 3160C	[Search 2] U, [Search 2] C

Analysis Cautions

3' end Primer Dimers
None above cutoff value

Any Primer Dimers
None above cutoff value

Molecules that do not produce a product
None

Primers that do not bind to any molecule
None

Gambar 6. Analisis sepasang primer dan gen *katG* sebagai templat DNA.

Repeat untuk masing-masing primer *forward* dan *reverse* yang telah didesain adalah 2 dan tidak terdapat *repeat*. *Repeat* adalah keberadaan nukleotida yang berulang secara teratur dan sedapat mungkin harus dihindari karena dapat menyebabkan *mispriming*. Jumlah maksimum *repeat* yang dapat diterima adalah 4 basa (Borah, 2011).

Primer yang telah didesain memiliki *runs* berjumlah 2 untuk masing-masing primer *forward* dan *reverse*. Adanya *runs* pada primer seharusnya dihindari karena dapat menyebabkan *mispriming*. Jumlah maksimum *runs* yang dapat diterima adalah 4 basa (Borah, 2011).

Kemudian dilakukan analisis menggunakan *analyze mix wizard*, yaitu simulasi secara *in silico* sepasang primer yang telah didesain dan sekuens gen *katG M. tuberculosis*

sebagai DNA templat. Hasil analisis tertera pada Gambar 6.

Dari hasil simulasi secara *in silico* yang tertera pada Gambar 6 tersebut, maka produk PCR yang akan dihasilkan yaitu berukuran 724 pasang basa yang terletak pada posisi 2437 sampai dengan 3160 DNA *M. tuberculosis*. Sehingga dapat disimpulkan bahwa primer yang telah didesain memenuhi daerah target yang diharapkan.

SIMPULAN DAN SARAN

Simpulan

1. Telah berhasil didesain sepasang primer dengan kriteria terbaik yaitu dengan urutan primer *forward* 5' GAAGTACGGCAAGAAGCTCTC 3' (21 nukleotida) dan urutan primer *reverse* 5' CGTGATCCGCTCATAGATCG 3' (20 nukleotida) dengan Tm masing-masing primer yaitu 62°C.
2. Primer yang didesain ditargetkan untuk produk DNA berukuran 724 pb.

Saran

Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut secara *in vitro* untuk mengetahui apakah primer yang di desain dapat dengan tepat mengamplifikasi daerah target dalam proses PCR sehingga menghasilkan produk DNA yang sesuai dengan simulasi secara *in silico*.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada semua pihak yang telah membantu sehingga penelitian ini dapat terlaksana dengan baik.

DAFTAR PUSTAKA

- Borah, P., 2011, Primer Designing for PCR, *Sci. Vis.*, 11 (3) : 134-136
- Bostanabad, S.Z., Titov, L.P., Bahrmand, A., and Nojumi, S.A., 2008, Detection of Mutation in Isoniazid-Resistant *Mycobacterium tuberculosis* Isolates From Tuberculosis Patients in Belarus, *Ind. J. Med. Microbiol.*, 26 (2) : 143-147

- Darwani, 2008, Deteksi Mutasi Gen *katG* S315T pada Isolat *Mycobacterium tuberculosis* Resisten INH dengan PCR-RFLP Asal Kota Surakarta dan Kota Yogyakarta, *Tesis*, Universitas Gajah Mada, Yogyakarta
- Dieffenbach, C.W., Lowe, T.M., and Dveksler, G.S., 1993, General Concepts for PCR Primer Design, *Gen. Res.*, 3 : 30-37
- Elsalam, K.A.A., 2003, Bioinformatic Tools and Guideline for PCR Primer Design, *Afr. Journ. Biotech*, 2,(5) : 91-95
- Handoyo, D. dan Ari R., 2001, Prinsip Umum dan Pelaksanaan *Polymerase Chain Reaction* (PCR), *Unitas*, 9 (1) : 17-29
- Neel, M., Ajay, R., Pallavi, C., and Sandeep K., 2010, Primer Design and Analysis of *Klebsiella granulomatis* Strain K22-14 16S rRNA Gene., *J. Pharm. Bio. Chem. Sci*, 1 (4) : 1054
- World Health Organization, 2010, *Multidrug and Extensively Drug-Resistant TB (M/XDR-TB)*, World Health Organization, France
- World Health Organization, 2011, *Global Tuberculosis Control 2011*, World Health Organization, France
- Wu, L.C., Jorng, T.H., His, Y.H., Feng, M.L., Hsien, D.H., and Meng, F.T., 2007, Primer Design for Multiplex PCR Using a Genetic Algorithm, *Soft Comput*, 11 : 855-863