

DESAIN PELACAR DNA SECARA *IN SILICO* SEBAGAI PENDETEKSI RESISTENSI FLUOROQUINOLONE PADA ISOLAT *MULTI DRUG RESISTANT TUBERCULOSIS*

Sagung Chandra Yowani^{1,2}, Jennifer Tamara², Ayu Nyoman Chandra Yustiana², Putu Sanna Yustiantara^{1,2}

¹ Kelompok Studi MDR-TB & XDR-TB, FMIPA, Universitas Udayana, Bukit Jimbaran, Bali-Indonesia, 80361
cyowani@gmail.com
pyustiantara@gmail.com

² Program Studi Farmasi, FMIPA, Universitas Udayana, Bukit Jimbaran, Bali-Indonesia, 80361
jenniferrtamara@gmail.com
chandra.yustiana12@gmail.com

ABSTRAK: Resistensi fluoroquinolone (FQ) pada *Multi Drug Resistant Tuberculosis* (MDR-TB) umumnya disebabkan oleh adanya sejumlah mutasi pada beberapa gen yang mengkode sensitivitas *Mycobacterium tuberculosis* dan sebagian besar terjadi pada gen *gyrA*. Mutasi pada kodon 94 gen *gyrA* merupakan mutasi yang paling sering terjadi dengan 7 variasi perubahan asam amino. Resistensi FQ dapat dideteksi menggunakan DNA *probe* yang spesifik agar dapat memberi terapi yang tepat pada pasien. Penelitian ini akan mendesain urutan nukleotida *TaqMan probe* menggunakan program Clone Manager Suite 9.2. Hasil rancangan DNA *probe* kemudian dianalisis dalam 2 tahap. Tahap pertama berdasarkan kriteria *probe* secara umum yaitu panjang (18-30 basa), %GC (40-60%), T_m (5-10°C lebih tinggi dibanding T_m primer), *runs* (≤ 4), *repeats* (≤ 4), dimer (≤ 4), dan tidak terbentuk *hairpin*. Selanjutnya tahap kedua berdasarkan kriteria pelabelan *TaqMan probe*, yaitu tidak terdapat basa G pada 2 nukleotida di ujung 5' dan jumlah basa C ≥ G. Rancangan DNA *probe* mutan menggunakan program menghasilkan 1 *probe* untuk mutasi spesifik D94G. *Probe* tersebut dianalisa dengan kriteria *probe* secara umum dan kriteria pelabelan *TaqMan probe*. Kesimpulan dari penelitian ini yaitu hasil rancangan *probe* mutan A94MG1 dengan urutan 5' – TCGATCTACGGCAGCCTGGT – 3' telah memenuhi kriteria pelabelan *TaqMan probe* dan dapat digunakan untuk mendeteksi adanya mutasi pada kodon 94 gen *gyrA Mycobacterium tuberculosis*.

Kata kunci: MDR-TB, gen *gyrA*, *in silico*, *TaqMan probe*, *Real-Time PCR*

ABSTRACT: Fluoroquinolone (FQ) resistance in Multi Drug Resistant Tuberculosis (MDR-TB) is generally caused by some mutations in several genes that encode the sensitivity of *Mycobacterium tuberculosis* and most of them occur in *gyrA* gene. Mutations in codon 94 *gyrA* gene are the most common mutations with 7 variations in amino acid changes. FQ resistance can be detected using a specific DNA probe to provide the precise therapy for the patient. This research will design the *TaqMan probe* nucleotide sequence using the Clone Manager Suite 9.2. program. The results of designing DNA probes were then analyzed by 2 stages. The first stage is based on criteria of the probe in general which is length (18-30 bases), GC% (40-60%), T_m (5-10°C higher than primer T_m), runs (≤ 4), repeats (≤ 4), dimer (≤ 4), and hairpin is not formed. Second stage is examination based on the labeling criteria for *TaqMan*, that is no G base at 2 nucleotides at the end of 5' and the amount of bases C ≥ G. The mutant DNA probe design using the program produced 1 probe for the D94G specific mutation. The probe was analyzed with general criteria and *TaqMan probe* labeling. The conclusion of this study is A94MG1 mutant probe design have met the *TaqMan probe* labeling criteria and can be used to detect mutations in the *Mycobacterium tuberculosis gyrA* gene codon 94.

Keywords: MDR-TB, *gyrA* gene, in silico, TaqMan probe, Real-Time PCR

1. PENDAHULUAN

Multi Drug Resistant Tuberculosis (MDR-TB) didefinisikan sebagai penyakit TB yang resisten terhadap setidaknya dua Obat Anti Tuberkulosis (OAT) lini pertama yaitu isoniazid dan rifampisin. Data *World Health Organization* (WHO) menunjukkan bahwa 3,5% kasus baru TB dan 18% kasus yang sudah ditangani mengalami MDR-TB. Pada kasus MDR-TB tahun 2017, 8,5% diantaranya diperkirakan berkembang menjadi *Extensively Drug Resistant Tuberculosis* (XDR-TB) [1].

Pasien MDR-TB telah resisten terhadap OAT lini pertama sehingga digunakan OAT lini kedua. Menurut WHO, golongan fluoroquinolone (FQ) merupakan obat lini kedua yang digunakan pada terapi MDR-TB, sehingga resistensi terhadap FQ dapat menyebabkan kegagalan terapi dan menjadi penanda kondisi XDR-TB [2].

Resistensi pada MDR-TB umumnya disebabkan oleh terjadinya sejumlah mutasi pada beberapa gen yang mengkode sensitivitas *Mycobacterium tuberculosis* terhadap OAT. FQ bekerja dengan menghambat DNA *gyrase* (salah satu DNA topoisomerase tipe II) dan topoisomerase IV yang diperlukan oleh bakteri untuk melakukan replikasi [3]. DNA *gyrase* merupakan target utama ikatan FQ pada bakteri karena tidak adanya topoisomerase IV dalam genom bakteri tersebut [4, 5]. DNA *gyrase* terdiri dari 2 subunit A dan 2 subunit B yang masing-masing dikode oleh gen *gyrA* dan gen *gyrB* [6]. *M. tuberculosis* resisten terhadap FQ terutama melalui mutasi di daerah penentu mutasi yang disebut dengan *Quinolone Resistance Determining Regions* (QRDR) [7,8]. Daerah QRDR gen *gyrA* berada diantara kodon 74-113 [4,9], sedangkan daerah gen *gyrB* berada diantara kodon 500-540 [8].

Pada kasus TB, resistensi FQ sebagian besar disebabkan oleh mutasi yang terjadi pada gen *gyrA*, sedangkan mutasi pada gen

gyrB jarang terjadi dengan prevalensi sebesar 1,6-4,1% [5,10,11]. Mutasi pada gen *gyrA* menyebabkan terjadinya perubahan asam amino seperti G88A, D89G, A90V, S91P, D94N, D94Y, D94G, D94A, D94H, D94C dan D94V [5,6,8]. Berdasarkan penelitian sebelumnya, daerah yang paling sering terjadi mutasi ditemukan pada gen *gyrA* kodon 94 dengan mutasi D94G sebesar 11,6-42,6%.

Salah satu cara mengetahui resistensi pada MDR-TB dilakukan dengan pendeteksian cepat agar dapat memberikan terapi yang tepat pada pasien. Deteksi *M. tuberculosis* yang resisten terhadap FQ dapat dilakukan dengan metode molekuler, yaitu metode *Real Time Polymerase Chain Reaction* (RT-PCR). RT-PCR memiliki komponen yang sama dengan PCR ditambah dengan DNA *probe* berupa molekul asam nukleat yang memiliki afinitas kuat dan dapat berikatan spesifik dengan target DNA. Jenis *probe* yang sering digunakan pada metode RT-PCR yaitu *TaqMan probe*. *Probe* jenis ini digunakan untuk mendeteksi adanya mutasi dan skrining subtipe spesifik dari mikroba patogen [12]. *TaqMan probe* merupakan urutan oligonukleotida yang memiliki pewarna *reporter* fluoresen pada ujung 5' dan pewarna *quencher* pada ujung 3' [13]. *TaqMan probe* mudah didesain dan disintesis, tetapi jika tidak dirancang dengan baik maka dapat terbentuk struktur sekunder seperti *dimer*, *hairpins*, *runs*, dan *repeat* selama proses RT-PCR [14].

Desain DNA *probe* atau pelacak DNA merupakan tahap yang kritis dan harus spesifik terhadap urutan DNA target untuk menghindari hibridisasi silang pada urutan yang memiliki banyak persamaan [15]. Desain DNA *probe* akan dibuat dengan perangkat lunak (*software*) *Clone Manager Suite 9.2.* Penelitian ini difokuskan untuk mendesain DNA *probe* yang memenuhi kriteria secara umum dan kriteria pelabelan

TaqMan probe. Daerah mutasi yang dipilih dalam perancangan DNA *probe* yaitu daerah QRDR gen *gyrA M. tuberculosis* pada kodon 94 dengan jenis mutasi D94G. Kodon tersebut dipilih sebagai target perancangan DNA *probe* didasarkan pada penelitian sebelumnya yaitu memiliki frekuensi mutasi yang paling sering terjadi dan berkaitan dengan resistensi FQ.

2. PERCOBAAN

2.1 Bahan dan Peralatan

Bahan

Bahan yang digunakan untuk mendesain *probe* yaitu urutan nukleotida gen *gyrA M. tuberculosis* H37Rv dari database [URL://www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov) dengan *Accession No.* NC_000962.3. Satu pasang primer gen *gyrA* terdiri dari primer *forward* (gen-*gyrA-F*) dengan urutan 5'-GCAGCTACATCGACTATGC-3' dan primer *reverse* (gen-*gyrA-R*) dengan urutan 5'-GGCTTCGGTGTACCTCATC-3'.

Primer gen *gyrA* tersebut merupakan desain terbaik secara *in silico* dan setelah dilakukan optimasi, suhu *annealing* yang paling optimal untuk gen *gyrA* adalah suhu 58°C. Primer tersebut telah terbukti mampu mengamplifikasi gen *gyrA* [16]. Penelitian desain DNA *probe* gen *gyrA M. tuberculosis* menggunakan data panjang dan T_m dari primer secara *in silico* sebagai acuan untuk menentukan kriteria perancangan DNA *probe*.

Peralatan

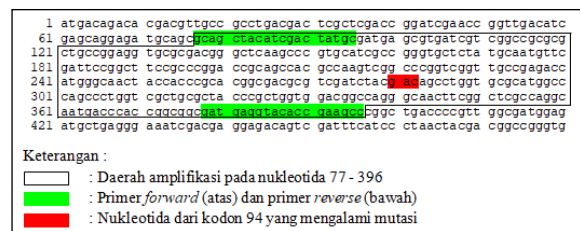
Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini diantaranya yaitu komputer dengan spesifikasi *Windows 10 32 bit*, konektivitas jaringan internet, dan *software Clone Manager Suite 9.2*.

2.2 Metode

Pemilihan Sekuens Target Rancangan DNA *Probe*

Daerah mutasi yang menjadi target perancangan DNA *probe* yaitu daerah QRDR gen *gyrA M. tuberculosis* yang terdiri dari 2517 pb. DNA *probe* untuk gen *gyrA M. tuberculosis* akan dirancang di

dalam daerah amplifikasi pada nukleotida 77 – 396. Pada Gambar 1, dapat dilihat bahwa daerah amplifikasi berada di dalam garis berwarna hitam dan sepasang primer yang membatasi daerah amplifikasi yang ditandai dengan warna hijau dan mencakup posisi terjadinya mutasi pada gen *gyrA M. tuberculosis*. Pemilihan kodon pada daerah QRDR gen *gyrA* sebagai target perancangan DNA *probe* mutan didasarkan pada frekuensi mutasi yang paling sering terjadi dan berkaitan erat dengan resistensi FQ yaitu pada kodon 94. Posisi kodon 94 ditandai dengan warna merah pada Gambar 1. Perancangan urutan DNA *probe* mutan mengacu pada perubahan nukleotida dari mutasi D94G dimana terjadi perubahan basa di posisi nukleotida ke 281 dari GAC menjadi GGC pada kodon 94.



Gambar 1. Urutan Nukleotida Gen *gyrA M. tuberculosis* Target Perancangan DNA *Probe*

Perancangan DNA *Probe*

Perancangan DNA *probe* dilakukan secara *in silico* menggunakan program *Clone Manager Suite 9.2*. Langkah awal yang dilakukan yaitu mengunduh urutan nukleotida gen *gyrA M. tuberculosis* H37Rv dengan *Accession No.* NC_000962.3 dalam format data FASTA dan disimpan dalam *notepad* sebagai *template*. *Probe* dirancang untuk mendeteksi mutasi D94G sehingga dilakukan penggantian basa pada *template* untuk memperoleh urutan *probe* mutan yang spesifik terhadap mutasi. Program *Clone Manager Suite 9.2* dijalankan dan diklik 'Primer' lalu pilih 'Design' lalu dimasukkan data sekuens gen *gyrA M. tuberculosis* dan klik 'OK'. Kemudian pada 'Primer Type' pilih 'Probe' dan pada kolom 'Design Detail' dimasukkan panjang

DNA *probe* yang divariasikan dari 18-30 basa pada bagian ‘*length*’ dan diatur daerah target yang diinginkan, lalu klik ‘OK’. Daerah target pada gen *gyrA* berada pada kodon 94 posisi nukleotida ke 281. Selanjutnya program akan memberikan beberapa data sekuens DNA *probe* dan diklik ‘*Primer report*’ untuk menampilkan urutan nukleotida, panjang, komposisi dan kriteria dari *probe*.

3. HASIL DAN PEMBAHASAN

Pemilihan Sekuens Target Rancangan DNA Probe

Pemilihan sekuens target rancangan DNA *probe* dilakukan penelusuran pustaka untuk mengetahui daerah pada gen *gyrA* *M. tuberculosis* yang paling sering terjadi mutasi dan menyebabkan resistensi FQ. Perancangan DNA *probe* dilakukan pada daerah QRDR gen *gyrA* *M. tuberculosis* dimana mutasi yang terjadi akan mengubah struktur QBP dan menyebabkan FQ tidak dapat berikatan dengan DNA *gyrase*. DNA *probe* akan dirancang pada kodon 94 karena kodon tersebut merupakan daerah kodon yang paling sering terjadi mutasi dan menghasilkan variasi asam amino sebanyak 7 jenis. Penelitian ini akan merancang DNA *probe* untuk mendeteksi mutasi dengan prevalensi tertinggi yaitu D94G. Perancangan DNA *probe* mutan dilakukan menggunakan urutan nukleotida *wild-type* dari gen *gyrA* *M. tuberculosis* yang dapat diperoleh secara *online* dari database [URL://www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov) dengan *Accession No.* NC_000962.3.

Hasil Perancangan DNA Probe

Probe merupakan urutan nukleotida yang memiliki afinitas kuat dengan target spesifik sehingga dapat digunakan untuk

mendeteksi adanya mutasi. Penelitian ini akan mendesain *probe* berjenis *TaqMan*. Keuntungan utama penggunaan *TaqMan probe* meliputi spesifisitas tinggi, rasio *signal-to-noise* yang tinggi, dan memiliki kemampuan untuk reaksi multipel. Sedangkan kelemahannya yaitu biaya *probe* yang tinggi [17]. Perancangan DNA *probe* mutan dapat dilakukan secara *in silico* menggunakan beberapa program diantaranya yaitu *Alleleid*, *Beacon Designer*, *Clone Manager Suite 9.2.*, *Probe Maker*, dan *Oligo7*. Penelitian ini menggunakan program *Clone Manager Suite 9.2.* karena ketersediaan program dan kode lisensi yang diperlukan untuk mengaktivasi program sehingga dapat digunakan secara lengkap. Program akan menghasilkan *probe* yang memenuhi kriteria yang telah ditetapkan. Pada penelitian sebelumnya, program *Clone Manager Suite 9.2.* telah digunakan untuk perancangan DNA *probe* mutan sehingga program tersebut terbukti dapat menghasilkan urutan DNA *probe* [18].

Perancangan DNA *probe* dilakukan dengan menjalankan program *Clone Manager Suite 9.2.* lalu dilakukan desain *probe* dengan memasukkan kriteria *probe* secara umum diantaranya yaitu memiliki panjang 18-30 basa, %GC 40-60%, T_m probe lebih tinggi 5-10°C daripada T_m primer, $dimer \leq 4$, $runs \leq 4$, $repeats \leq 4$, dan tidak ada *hairpins*. Selanjutnya diatur daerah target terjadinya mutasi. Posisi mutasi berpengaruh terhadap hibridisasi dari *probe* dimana *mismatch* antara *probe* dan target akan menyebabkan efisiensi hibridisasi *probe* menurun. Pada kondisi tersebut, enzim *Taq polymerase* akan memanjangkan target *probe* tanpa mendegradasi *probe*, sehingga fluoresensi reporter menjadi tidak terdeteksi [19].

Tabel 1. Kriteria Hasil Perancangan DNA Probe Mutan Untuk Deteksi Mutasi Spesifik D94G

Nama Probe	Urutan Nukleotida Probe	Kriteria Desain DNA Probe Secara <i>In Silico</i>						
		Pjg	T_m	%GC	Dimer	Runs	Repeats	Hairpin
Desain probe spesifik untuk mutasi D94G								
A94MG1	TCGATCTACG GCAGCCTGGT	20	67	60	4	2	-	-

Pada tahap ini, program akan menghasilkan beberapa data sekuens DNA *probe* mutan dan diklik 'Primer report' untuk menampilkan urutan nukleotida, panjang, komposisi dan kriteria lainnya dari *probe* yang dihasilkan. *Probe* diberi nama dan dimasukkan ke dalam tabel beserta kriterianya. Penamaan *probe* dilakukan dengan huruf dan angka, misal A94MG1 artinya A menunjukkan gen *gyrA* M. tuberculosis, 94 menunjukkan kodon target, M menunjukkan jenis rancangan *probe* mutan, G menunjukkan singkatan asam amino yang terbentuk akibat mutasi, dan 1 menunjukkan nomor *probe* yang dihasilkan. Hasil perancangan *probe* mutan untuk mutasi spesifik D94G terdapat sebanyak 1 sekuens yang ditunjukkan pada Tabel 1.

Hasil Analisis Rancangan DNA Probe

Hasil desain *probe* mutan dianalisa menggunakan menu 'Direct entry'. Sekuens *probe* yang memenuhi seluruh kriteria umum akan ditampilkan dengan tanda centang (✓), sedangkan sekuens *probe* yang tidak memenuhi kriteria akan ditampilkan dengan tanda peringatan (!). Contoh tampilan hasil analisis *probe* A94MG1 menggunakan program ditunjukkan pada Gambar 2.

Analisis tahap awal dilakukan berdasarkan kriteria *probe* secara umum yang meliputi panjang nukleotida, kandungan %GC, T_m , runs, repeats, dimer, dan hairpin. Kriteria *probe* secara umum yang pertama yaitu memiliki panjang nukleotida yang berkisar antara 18-30 basa dengan panjang optimal 20 basa [13]. Panjang dari *probe* dapat mempengaruhi spesifisitas PCR, dimana *probe* yang terlalu panjang dapat meningkatkan peluang terjadinya *mismatch* antara *probe* dan DNA target. *Probe* akan bersifat kurang spesifik untuk membedakan *mismatch* sehingga dapat menyebabkan hasil positif yang palsu terutama ketika perbedaan antara 2 atau lebih *probe* hanya sebuah nukleotida tunggal [20]. *Probe* yang lebih pendek dapat mengurangi spesifisitas [21] dan

membutuhkan waktu yang lebih sedikit untuk hibridisasi secara spesifik ke DNA targetnya [22]. Hasil rancangan *probe* mutan memiliki panjang dari 20 nukleotida sehingga memenuhi kriteria.

Sequence:	TCGATCTACGGCAGCCTGGT							
Length:	20							
Composition:	A: 3	C: 6	G: 6	T: 5				
Molar absorbance:	33.1 $\mu\text{g/ml} = 1 \text{ OD}_{260}$							
Analysis criteria:	Probe							
	%GC	T_m °C	Dimers	Stability	GC clamp	Runs	Hairpin	Hom
	60	67	OK	n/a	n/a	OK	OK	-
Sequence:	TCGATCTACGGCAGCCTGGC							
Length:	20							
Composition:	A: 3	C: 7	G: 6	T: 4				
Molar absorbance:	33.4 $\mu\text{g/ml} = 1 \text{ OD}_{260}$							
Analysis criteria:	Probe							
	%GC	T_m °C	Dimers	Stability	GC clamp	Runs	Hairpin	Hom
	65	69	OK	n/a	n/a	OK	OK	-

Gambar 2. Contoh tampilan hasil analisis pada program *Clone Manager Suite 9.2*.

Kriteria kedua yaitu memiliki kandungan %GC sebesar 40-60% [12,22, 23]. Nilai %GC berhubungan dengan T_m dimana semakin tinggi GC maka nilai T_m juga semakin tinggi. Hal tersebut disebabkan oleh pasangan basa G-C dihubungkan oleh ikatan hidrogen rangkap 3 dan pasangan basa A-T yang dihubungkan oleh ikatan hidrogen rangkap 2 [24]. Hasil rancangan *probe* mutan memiliki kandungan %GC sebesar 60% sehingga masih memenuhi kriteria.

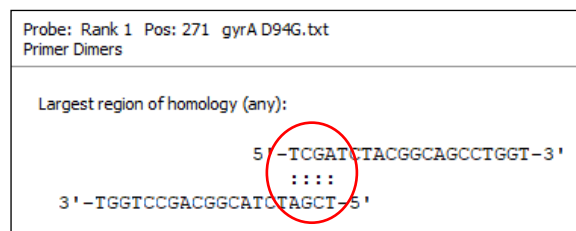
Kriteria ketiga dari *probe* yaitu memiliki T_m 5-10°C lebih tinggi dari T_m dari primer [17, 25]. T_m *probe* harus lebih besar dari T_m primer untuk memastikan ikatan yang terbentuk kuat selama fase penempelan. T_m *probe* bergantung dari panjang dan kandungan %GC [21]. Perbedaan nilai T_m *probe* dengan primer akan menjamin *probe* dapat terhibridisasi dengan target selama proses ekstensi primer terjadi, sehingga akan meningkatkan sinyal fluoresens pada proses amplifikasi [13]. T_m *probe* yang lebih tinggi memungkinkan *probe* tetap terhibridisasi

dengan DNA target sebelum proses pemanjangan *primer* [26]. Nilai T_m *probe* yang melebihi 80°C dapat menghambat ekstensi polimerase karena polimerase tidak dapat melepaskan *probe* yang telah terhibridisasi [25]. T_m dari hasil rancangan *probe* mutan yaitu 67°C telah sesuai dengan kriteria yaitu 5-10°C diatas T_m primer (60°C dan 61°C).

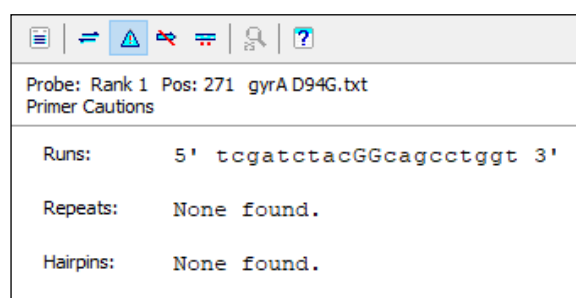
Kriteria keempat dan kelima yaitu DNA *probe* memiliki *runs* dan *repeats* maksimal sebanyak 4 basa. *Runs* yang melebihi 4 basa khususnya basa G dan C akan menyebabkan *mispriming* dan oligonukleotida terlipat satu sama lain sehingga membentuk struktur sekunder [13, 23]. *Probe* diharapkan tidak mengandung *repeats* karena pengulangan 2 nukleotida yang sama berturut-turut (dinukleotida) memungkinkan *probe* tidak dapat berhibridisasi dengan benar pada target [27]. Pengulangan dinukleotida dapat menghasilkan urutan yang komplemen dan membentuk struktur sekunder [28]. Pada hasil rancangan, *probe* memiliki *runs* sebanyak 2 dan tidak ada *repeats* sehingga masih memenuhi kriteria.

Kriteria selanjutnya yang perlu diperhatikan yaitu *probe* harus memiliki dimer sedikit. Dimer terbentuk oleh interaksi intermolekuler antara dua *probe* [23]. Adanya dimer pada *probe* dapat mengurangi efisiensi hibridisasi sehingga menimbulkan penurunan sensitivitas deteksi [29]. Pada hasil rancangan terbentuk dimer sebanyak 4 yang dapat dilihat pada Gambar 3. Dimer yang terbentuk yaitu *dimers any* dimana dimer berada pada daerah selain di ujung 3'. Pada program *Clone Manager Suite 9.2.*, *dimers any* yang diperbolehkan yaitu maksimal 5 basa, sehingga hasil rancangan masih memenuhi kriteria. Kriteria terakhir yaitu *probe* tidak boleh terbentuk *hairpin* yang dapat menghambat hibridisasi dengan target [12,23]. Keberadaan struktur sekunder akan mempengaruhi *probe* dikarenakan adanya interaksi intermolekuler maupun intramolekuler pada sekuens [23]. Hasil rancangan *probe*

tidak mengandung *hairpins* dan memenuhi kriteria. Hasil analisis *runs*, *repeats*, dan *hairpins* ditunjukkan pada Gambar 4.



Gambar 3. Hasil analisis dimer pada program *Clone Manager Suite 9.2.*

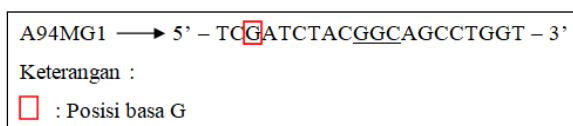


Gambar 4. Hasil analisis *runs*, *repeats*, dan *hairpins* pada program *Clone Manager Suite 9.2.*

Hasil desain *probe* mutan telah memenuhi kriteria *probe* secara umum sehingga dapat dilanjutkan dengan analisis berdasarkan kriteria pelabelan *TaqMan probe*. *TaqMan probe* merupakan *probe* yang memiliki pewarna *reporter* fluoresen yang melekat pada ujung 5' dan pewarna *quencher* pada ujung 3' [30]. Dalam RT-PCR, sebuah molekul *reporter* fluoresensi digunakan untuk memantau saat proses PCR berlangsung. Fluoresensi yang dipancarkan oleh molekul *reporter* menunjukkan produk PCR dan terakumulasi pada setiap siklus amplifikasi. Jika pewarna *reporter* berada di dekat pewarna *quencher*, sinyal fluoresensi yang dihasilkan oleh *reporter* akan diserap atau dipadamkan oleh pewarna *quencher* sehingga tidak ada sinyal fluoresensi. Hal ini disebut sebagai fenomena FRET (*Fluorescence Resonance Energy Transfer*) [14]. FRET merupakan fenomena kuantum

yang terjadi antara dua molekul pewarna. Energi eksitasi ditransfer diantara kedua pewarna fluorofor melalui interaksi dipol-dipol tanpa emisi foton sehingga mengakibatkan fluoresensi *reporter* akan padam [31].

Kriteria pertama dari pelabelan *TaqMan probe* yaitu tidak boleh ada basa G pada posisi nukleotida pertama dan kedua dari ujung 5' [27]. Basa G tidak dianjurkan berada pada ujung 5' karena basa G dapat memadamkan fluoresensi dari pewarna *reporter* [13,26,31]. Kemampuan basa G mengabsorpsi fluoresensi terjadi melalui transfer elektron yang diinduksi oleh cahaya [32]. Hasil desain *probe* A94MG1 memenuhi kriteria tersebut.



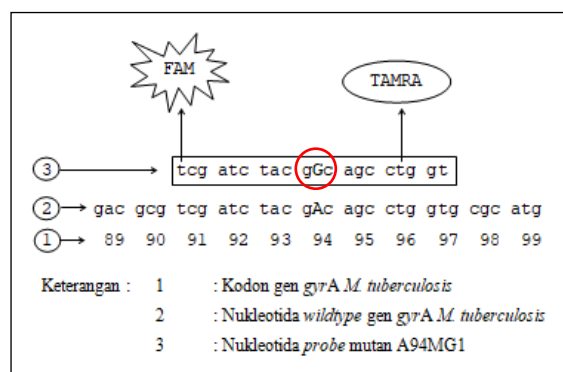
Gambar 5. Posisi basa G pada *probe* A94MG1, A94MA1, dan A94MY9.

Kriteria kedua yaitu *probe* mengandung jumlah basa C lebih banyak atau sama dengan basa G [13]. Jumlah kandungan basa G yang lebih banyak berpengaruh pada penurunan sinyal fluoresensi, sedangkan jumlah kandungan basa C yang lebih banyak akan meningkatkan fluoresensi yang dihasilkan selama proses PCR. Hal tersebut berkaitan dengan sifat alami basa G yang dapat memadamkan sinyal fluoresensi dari pewarna *reporter* [31]. *Probe* A94MG1 memenuhi kedua kriteria dari pelabelan *TaqMan probe* tersebut.

Probe A94MG1 yang telah memenuhi kriteria pelabelan *TaqMan* dapat ditempelkan label yang terdiri dari *reporter* dan *quencher*. Pemilihan kedua pewarna penting dalam mendesain *TaqMan probe* agar dapat terdeteksi pada instrumen [33]. Label yang biasanya digunakan untuk *TaqMan probe* adalah FAM sebagai *reporter* dan TAMRA sebagai *quencher* [29]. Label *reporter* FAM merupakan pewarna donor sebagai derivat *fluorescein* dengan emisi fluoresensi kuat yang

digunakan untuk memonitoring amplikon hasil amplifikasi pada setiap siklus PCR dan dapat berikatan spesifik dengan DNA *probe* [17,25,29]. Penggunaan label FAM untuk *reporter* dianjurkan saat mendesain reaksi tunggal karena lebih murah, berkinerja baik, dan dapat dideteksi oleh semua instrumen yang ada di pasaran [33]. Label *quencher* TAMRA merupakan pewarna akseptor sebagai derivat rodamin yang dapat mengabsorpsi emisi dari *reporter* saat kedua pewarna berada dalam posisi yang berdekatan [17,25,29].

Kedua label *reporter* dan *quencher* ditempelkan pada ujung berlawanan pada urutan nukleotida *probe* mutan. Pelabelan pewarna direkomendasikan agar dilekatkan pada basa C atau T, tetapi umumnya dilekatkan pada basa T [26]. Penelitian Proudnikov *et al.* (2003) melaporkan bahwa pelabelan *quencher* TAMRA yang ditempatkan di posisi sentral dari oligonukleotida memberikan sensitivitas yang lebih tinggi sebanyak 30 kali lipat daripada di posisi ujung 3' [34]. Pemasangan label pada desain *probe* mutan A94MG1 dapat dilihat pada Gambar 6. Label *reporter* ditempelkan pada basa T di ujung 5' dan label *quencher* ditempelkan di basa T pada posisi basa ke 17 dari ujung 5'.



Gambar 6. Pelabelan desain *probe* mutan A94MG1 yang spesifik terhadap perubahan A → G pada kodon 94.

Pada penelitian ini, hasil desain *TaqMan probe* dapat digunakan secara spesifik untuk mendeteksi mutasi D94G pada gen *gyrA M. tuberculosis* kodon 94.

Probe A94MG1 merupakan *probe* terpilih yang telah melewati analisis kriteria *probe* secara umum dan kriteria pelabelan *TaqMan probe*. Pada saat *probe* tersebut berhibridisasi dengan urutan target, *probe* akan mengalami hidrolisis oleh enzim *Taq* polimerase dan menghasilkan sinyal fluoresens yang dapat ditangkap oleh detektor. Sinyal yang ditangkap detektor sebanding dengan jumlah ampikon dari hasil amplifikasi pada reaksi PCR. *Probe* yang tidak terhibridisasi dengan urutan target menandakan tidak adanya mutasi pada isolat, sehingga *probe* tidak menghasilkan sinyal fluoresens. Penggunaan hasil desain *probe* mutan dapat memberikan hasil positif palsu dengan adanya mutasi pada kodon lain. Maka dari itu, perlu dilakukan pengujian lebih lanjut secara eksperimental di laboratorium untuk membuktikan efisiensi kerja dari desain *TaqMan probe* A94MG1.

4. KESIMPULAN

Hasil rancangan DNA *probe* mutan terbaik yang telah memenuhi kriteria *probe* secara umum dan kriteria pelabelan *TaqMan probe* yaitu *probe* A94MG1 dengan urutan 5' – TCGATCTACGGCAGCCTGGT – 3' untuk deteksi spesifik mutasi D94G pada kodon 94 gen *gyrA M. tuberculosis*.

5. DAFTAR PUSTAKA

- [1] World Health Organization. 2018, *Global Tuberculosis Report 2018*, Perancis: World Health Organization.
- [2] Malik, S., Willby, M., Sikes, D., Tsodikov, O. V. and Posey, J. E. 2012, New Insights into Fluoroquinolone Resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: Functional Genetic Analysis of *gyrA* and *gyrB* Mutations, *Plos One*, 7: 1-10.
- [3] Rinanda, T. 2015, Kajian Molekuler Mekanisme Resistensi *Mycobacterium tuberculosis*, *Jurnal Kedokteran Syiah Kuala*, 15: 162-167.
- [4] Maruri, F., Sterlin, T. R., Kaiga, A. W., Blackman, A., Heijden, Y. F., Mayer, C., et al. 2012, A systematic review of gyrase mutations associated with fluoroquinolone-resistant *Mycobacterium tuberculosis* and a proposed gyrase numbering system, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 67: 819-831.
- [5] Disratthakit, A., Prammananan, T., Tribuddharat, C., Thaipisuttikul, I., Doi, N., Leechawengwongs, M., et al. 2016, Role of *gyrB* Mutations in Pre-extensively and Extensively Drug-Resistant Tuberculosis in Thai Clinical Isolates, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 60: 5189-5197.
- [6] Zhang, Z., Lu, J., Wang, Y., Pang, Y., and Zhao, Y. 2014, Prevalence and Molecular Characterization of Fluoroquinolone-Resistant *Mycobacterium tuberculosis* Isolates in China, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 58: 364-369.
- [7] Da Silva, P. E. A. and Palomino, J. C. 2011, Molecular basis and mechanisms of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: classical and new drugs, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 66: 1417-1430.
- [8] Li, J., Gao, X., Luo, T., Wu, J., Sun, G., Liu, G., et al. 2014, Association of *gyrA/B* mutations and resistance levels to fluoroquinolones in clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis*, *Emerging Microbes and Infections*, 3: 1-5.
- [9] Avalos, E., Catanzaro, D., Catanzaro, A., Ganiats, T., Brodine, S., Alcaraz, J., et al. 2015, Frequency and Geographic Distribution of *gyrA* and *gyrB* Mutations Associated with Fluoroquinolone Resistance in Clinical *Mycobacterium tuberculosis* Isolates: A Systematic Review, *Plos One*, 10: 1-24.

- [10] Yin, X. and Yu, Z. 2010, Mutation characterization of *gyrA* and *gyrB* genes in levofloxacin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates from Guangdong Province in China, *Journal of Infection*, 61: 150-154.
- [11] Cui, Z., Wang, J., Lu, J., Huang, X., and Hu, Z. 2011, Association of mutation patterns in *gyrA/B* genes and ofloxacin resistance levels in *Mycobacterium tuberculosis* isolates from East China in 2009, *BMC Infections Diseases*, 11: 1-5.
- [12] Walker, J. M. and Rapley, R. 2005, *Medical Biomethods Handbook*, Humana Press Inc., New Jersey.
- [13] McPherson, M. J. and Moller, S. G. 2006, *PCR Second Edition*, Taylor & Francis Group, New York.
- [14] Navarro, E., Serrano-Heras, G., Castano, M. J., and Solera, J. 2015, Real-time PCR detection chemistry, *Clinica Chimica Acta*, 439: 231-250.
- [15] Chou, C., Chen, C., Lee, T., and Peck, K. 2004, Optimization of probe length and the number of probes per gene for optimal microarray analysis of gene expression, *Nucleic Acids Research*, 32: 1-8.
- [16] Sasmita, L. V. 2017, Eksplorasi Mutasi Gen *gyrA* Sebagai Penanda *Extensively Drugs Resistant Tuberculosis* pada Isolat Klinik *Multidrug-Resistant Tuberculosis* di Bali dengan Metode *Polymerase Chain Reaction*, Skripsi, Program Studi Farmasi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Udayana.
- [17] Anonim a. 2006, Real-Time PCR Applications Guide. *Bulletin 5279*, Bio-Rad Laboratories Inc., USA. Available At: http://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/Bulletin_5279.pdf
- [18] Pebriani, N. N. 2019, Desain DNA Probe secara *In Silico* Sebagai Pendeteksi Mutasi Gen *gyrA* dan *gyrB* *Mycobacterium tuberculosis* untuk Metode *Real Time Polymerase Chain Reaction*, Skripsi, Program Studi Farmasi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Udayana.
- [19] Anonim b. 2001, *Allelic Discrimination Using The 5' Nuclease Assay*, Applied Biosystems, USA, Available At: http://www.austincc.edu/mlt/mdfund/mdfund_Unit11AllelicDiscrimination.pdf
- [20] Alvandi, E. and Koohdani, F. 2014, Zip Nucleic Acid: A New Reliable Method To Increase The Melting Temperature of Real-Time PCR Probes, *Journal of Diabetes & Metabolic Disorders*, 13: 1-4.
- [21] Rodriguez, A., Rodriguez, M., Cordoba, J. J., and Andrade, M. J. 2015, 'Design of Primers and Probes for Quantitative Real-Time PCR Methods' in Basu, C., *PCR Primer Design*, 2nd ed, Humana Press, New York, pp. 31-53.
- [22] Narayanan, S. 1992, Overview of Principles and Current uses of DNA Probes in Clinical and Laboratory Medicine, *Annals of Clinical and Laboratory Science*, 22: 353-376.
- [23] Borah, P. 2011, Primer Designing for PCR, *Science Vision*, 11: 134-136.
- [24] Patel, N. K., and Prakash, N. 2013, Principle and Tools For Primer Design, *Atmiya Spandan Biological Sciences*, 1: 79-95.
- [25] Meuer, S. C., Wittwer, and Nakagawara, K. 2001, *Rapid Cycle Real-Time PCR: Method and Applications*, Springer, Berlin.
- [26] Bishop, J. L., Campbell, S. A., Farrell, P., Fitzgerald, M., Haugen, M., Kocmond, W., Madden, D. E., Murray, W. E., and Persing, D. H. 2015, Designing Real Time Assays on the SmartCycler® II System, Cepheid Technical Support, United States, pp 1-8, Available At: <http://www.cepheid.com/en/compon>

- [nt/phocadownload/category/5-support?download=87:smart-note-6-1](#)
- [27] Rychlik, W. 2010, *OLIGO Primer Analysis Software Version 7*, Molecular Biology Insights, Inc., USA.
- [28] Yuwono, T. 2008, *Biologi Molekuler*, Penerbit Erlangga, Jakarta. pp. 49-74.
- [29] Dorak, M. T. 2007, *Real-Time PCR*, Taylor and Francis Group, New York.
- [30] Arya, M., Shergill, I. S., Williamson, M., Gommersall, L., Arya, N., and Patel, H. R. H. 2005, Basic principles of real-time quantitative PCR, *Experts Rev. Mol. Diagn.*, 5: 209-219.
- [31] Rodriguez-Lazaro, D. and Hernandez, M. 2013, Real-Time PCR in Food Science: Introduction, *Curr. Issues Mol. Biol.*, 15: 25-38.
- [32] Murray, J. L., Hu, P., and Shafer, D. A. 2014, Seven Novel Probe Systems for Real-Time PCR Provide Absolute Single-Base Discrimination, Higher Signaling, and Generic Components, *The Journal of Molecular Diagnostics*, 16: 627-628.
- [33] Seifi, M., Ghasemi, A., Heidarzadeh, S., Khosravi, M., Namipashaki, A., Soofiany, V. M., et al. 2012, 'Overview of Real-Time PCR Principles' in Hernandez-Rodriguez, P., *Polymerase Chain Reaction*, InTechOpen, London.
- [34] Proudnikov, D., Yuferov, V., Zhou, Y., LaForge, K. S., Ho, A., and Kreek, M. J. 2003, Optimizing primer-probe design for fluorescent PCR, *Journal of Neuroscience Methods*, 123: 31-45.