

## DESAIN DNA PELACAK SECARA *IN SILICO* SEBAGAI PENDETEKSI MUTASI PADA GEN *embB* *Mycobacterium tuberculosis*

Ade Ari Sundari<sup>1</sup>, Ni Putu Monica Rosdiana Dewi Paramitha<sup>1</sup>, Sagung Chandra Yowani<sup>2</sup> dan Putu Sanna Yustiantara<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Program Studi Farmasi, FMIPA, Universitas Udayana, Bukit Jimbaran, Bali-Indonesia, 80361

[arisundari2@gmail.com](mailto:arisundari2@gmail.com)

[monica.rosdianadp@gmail.com](mailto:monica.rosdianadp@gmail.com)

<sup>2</sup> Kelompok Studi MDR-TB & XDR-TB, FMIPA, Universitas Udayana, Bukit Jimbaran, Bali-Indonesia, 80361

[cyowani@gmail.com](mailto:cyowani@gmail.com)

[pyustiantara@gmail.com](mailto:pyustiantara@gmail.com)

**ABSTRAK:** Terapi lini pertama Tuberkulosis (TB) selalu menggunakan terapi kombinasi yaitu rifampisin, isoniazid, etambutol, dan pirazinamid. Penggunaan etambutol dalam terapi kombinasi TB digunakan untuk mencegah terjadinya resistensi terhadap obat lain namun tingkat resistensi etambutol secara bertahap meningkat. Mutasi pada operon *embCAB* bertanggung jawab pada resistensi etambutol dengan prevalensi tertinggi terjadi pada kodon 306 gen *embB*. Mutasi pada gen *embB* kodon 306 juga dikaitkan dengan adanya kecenderungan resistensi akibat peningkatan konsumsi obat sehingga dijadikan sebagai kandidat *potential marker* untuk *board drug resistance*, khususnya untuk MDR-TB. Penelitian ini akan mendesain urutan nukleotida *TaqMan probe* untuk mendeteksi mutasi M306I menggunakan program *Clone Manager Suite 9.2*. Hasil rancangan *probe* DNA kemudian dianalisis berdasarkan kriteria *probe* secara umum dan berdasarkan kriteria pelabelan *TaqMan probe*. Rancangan *probe* DNA mutan menggunakan program menghasilkan 10 *probe* yang memenuhi kriteria *probe* secara umum untuk mutasi M306I pada gen *embB*. Berdasarkan analisa pelabelan *TaqMan probe*, diperoleh 7 *probe* (E306MI4, E306MI5, E306MI6, E306MI7, E306MI9, E306MI10, dan E306MI13) untuk deteksi mutasi M306I pada gen *embB*. Hasil rancangan *probe* mutan yang telah memenuhi kriteria pelabelan *TaqMan probe* dapat digunakan untuk mendeteksi adanya mutasi kodon 306 gen *embB* *Mycobacterium tuberculosis*. Hasil perancangan *TaqMan probe* perlu diuji secara eksperimental untuk membuktikan efisiensi kerja dari *probe* tersebut agar dapat digunakan pada metode *Real-Time PCR*.

**Kata kunci:** Tuberkulosis, gen *embB*, *in silico*, *TaqMan probe*, *Real-Time PCR*.

**ABSTRACT:** First-line Tuberculosis (TB) therapy always uses combination therapy, such as rifampicin, isoniazid, ethambutol, and pyrazinamide. Ethambutol was effective for preventing treatment failures caused by *Mycobacterium tuberculosis* isolates resistant to other anti-TB drugs however, the resistance rate of ethambutol has gradually increased. Mutations in the *embCAB* operon have been identified to confer resistance to ethambutol, with *embB* codon 306 being the most frequently affected. *embB306* mutations are associated a tendency for resistance due to increasing numbers of antibiotics consumption so it may be a potential marker for broad drug resistance, especially for MDR-TB. This research design the *TaqMan probe* nucleotide sequence for the M306I specific mutation using the *Clone Manager Suite 9.2* program. The results of the DNA probe design were then analyzed based on *probe* criteria in general and based on the *TaqMan probe* labeling criteria. The mutant DNA probes design using the program produced 10 probes that have met the general probe criteria for the M306I

mutation in the *embB* gene. Based on the TaqMan probe labeling analysis, there are 7 probes (E306MI4, E306MI5, E306MI6, E306MI7, E306MI9, E306MI10 and E306MI13) for the detection of M306I mutations in the *embB* gene. The results of the mutant probe design that has met the TaqMan labeling criteria can be used to detect mutations in *M. tuberculosis embB* gene codon 306. The results of the TaqMan probe need to be tested experimentally to prove the working efficiency of the probe so that it can be used in the Real-Time PCR method.

**Keywords:** Tuberculosis, *embB* gene, in silico, TaqMan probe, Real-Time PCR

## 1. PENDAHULUAN

*Drug-resistant Tuberculosis* (TB), khususnya resistensi obat anti tuberkulosis (OAT) lini pertama merupakan salah satu hambatan utama dalam pengendalian TB. Data *World Health Organization* (WHO) menunjukkan bahwa pada 19% kasus baru TB dan 43% kasus yang sudah ditangani, mengalami resistensi terhadap OAT lini pertama [1]. Pengobatan TB selalu menggunakan kombinasi obat untuk efektivitas terapi. Obat-obat lini pertama yang digunakan adalah isoniazid, rifampisin, etambutol, dan pirazinamid. Etambutol merupakan obat pilihan yang digunakan untuk mencegah terjadinya resistensi terhadap obat lain dalam terapi kombinasi. Awalnya, penggunaan etambutol efektif untuk mencegah kegagalan pengobatan yang disebabkan isolat *M. tuberculosis* yang resisten terhadap OAT lainnya. Sejalan dengan kondisi tersebut, tingkat resistensi etambutol secara bertahap meningkat dan hampir 50% pada pasien TB *retreated* [2]. Laporan terakhir WHO tentang resistensi OAT pada tahun 2008 menyatakan bahwa resistensi global terhadap etambutol mencapai 2,5% di antara kasus TB baru dan 10,3% diantara kasus yang telah diobati sebelumnya [3].

Etambutol bekerja melalui penghambatan arabinosil transferase yang dikode oleh operon *embCAB* serta penghambatan sintesis arabinogalactan dan lipoarabinomannan pada dinding sel *M. tuberculosis*. Operon tersebut terdiri dari tiga gen yang berdekatan yang terdiri dari *embC*, *embA*, dan *embB* [4]. Mutasi pada gen *embB*, terutama pada daerah

*Ethambutol Resistance Determining Region* (ERDR), bertanggung jawab pada resistensi etambutol [5]. Prevalensi tertinggi mutasi gen *embB* terjadi pada kodon 306 sebesar 30-69%, sehingga identifikasi mutasi khususnya pada gen *embB* kodon 306, dianggap mewakili metode skrining cepat untuk deteksi resistensi etambutol pada isolat klinis [6]. Mutasi pada kodon 306 menyebabkan perubahan asam amino seperti perubahan metionin menjadi valin (M306V), metionin menjadi leusin (M306L), dan metionin menjadi isoleusin (M306I). Perubahan asam amino yang paling sering terjadi adalah metionin menjadi valin [7, 8]

Beberapa penelitian menyatakan bahwa mutasi pada *embB306* tidak selalu berhubungan dengan resistensi etambutol tetapi dikaitkan dengan adanya kecenderungan resistensi akibat peningkatan konsumsi obat-obatan. Pada penelitian Cordoba *et al.* [8] dinyatakan bahwa isolat yang membawa mutasi pada *embB306* juga memiliki resistensi terhadap isoniazid (95%), etambutol (91%), rifampisin (86%), MDR-TB (86%), dan etambutol + isoniazid + rifampisin (82%). Hasil penelitian Li *et al.* [4] juga menyatakan bahwa mutasi *embB306* dapat ditemukan pada 30,4% isolat resisten isoniazid, 37,0% isolat resisten rifampisin, 56,5% isolat resisten etambutol, dan 44,0% isolat MDR-TB. Hubungan yang signifikan antara mutasi *embB306* dan resistensi terhadap etambutol, isoniazid, rifampisin, dan MDR-TB, menunjukkan bahwa mutasi di *embB306* dapat dijadikan sebagai kandidat *potential marker* untuk *board drug resistance*, khususnya untuk MDR-TB

[4,8,9]. Dengan adanya fenomena tersebut, maka deteksi adanya mutasi pada gen *embB* pada kodon 306 dijadikan fokus dalam penelitian ini.

Deteksi *M. tuberculosis* yang mengalami mutasi dapat dilakukan dengan metode *Real-Time Polymerase Chain Reaction* (RT-PCR) menggunakan *probe* atau pelacak. *Probe* merupakan molekul asam nukleat berupa DNA beruntai tunggal dengan afinitas yang kuat dengan target spesifik. Urutan *probe* DNA harus spesifik terhadap urutan DNA target sehingga perancangan *probe* DNA diperlukan untuk menghindari hibridisasi silang pada urutan yang memiliki banyak persamaan [10]. Sistem deteksi *probe* DNA yang digunakan untuk RT-PCR terdapat beberapa macam, salah satunya adalah *TaqMan probe*. *TaqMan probe* merupakan jenis *probe* hidrolisis yang bekerja dengan melibatkan aktivitas eksonuklease dari *Taq* DNA polimerase [11]. *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 [12].

Penelitian ini akan berfokus pada perancangan DNA pelacak yang digunakan untuk mendeteksi mutasi dengan prevalensi tertinggi gen *embB* kodon 306 *M. tuberculosis* dengan metode RT-PCR. Gen tersebut dipilih untuk mendeteksi adanya *board drug resistance* lebih awal, khususnya untuk MDR-TB.

## 2. PERCOBAAN

### 2.1 Bahan dan Peralatan

#### Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini yaitu urutan nukleotida gen *embB* (*accession number*: NC\_000962) *M. tuberculosis* H37Rv dari *database* URL://www.ncbi.nlm.nih.gov. Satu pasang primer dengan urutan primer *forward* 5' ACCTTCGCCAACTTCGTC 3' dan primer *reverse* dengan urutan 5' CGCCAGCAGGTTGTAATACCAG 3'. Primer tersebut merupakan primer terbaik

yang di desain secara *in silico* yang memiliki suhu *annealing* 58°C. Penelitian ini akan menggunakan panjang dan  $T_m$  primer sebagai acuan dalam mendesain *probe* DNA.

### Peralatan

Peralatan yang digunakan diantaranya komputer dengan spesifikasi *Windows 10*, jaringan internet, dan program *Clone Manager Suite 9.2* untuk mendesain serta menganalisis hasil rancangan *probe* DNA.

## 2.2 METODE

### Pemilihan Sekuens Target Rancangan *Probe* DNA

Perancangan *probe* DNA menggunakan keseluruhan urutan nukleotida gen *embB* yang terdiri dari 3297 pb. Pemilihan kodon 306 gen *embB* sebagai target perancangan *probe* DNA didasarkan pada frekuensi mutasi yang paling sering terjadi dan berkaitan dengan adanya *board drug resistance* khususnya untuk MDR-TB. Perancangan *probe* DNA akan mengacu pada perubahan asam amino pada kodon 306 gen *embB* yaitu metionin menjadi isoleusin (M306I) dengan perubahan nukleotida ATG menjadi ATA. Gambar 1. menunjukkan posisi kodon 306 gen *embB* ditandai dengan warna kuning.



**Gambar 1.** Posisi kodon 306 gen *embB* sebagai kodon target perancangan *probe* DNA

### Perancangan *Probe* DNA

Perancangan *probe* DNA dilakukan secara *in silico* dengan mengunduh urutan nukleotida gen *embB* (*accession number*: NC\_000962) *M. tuberculosis* H37Rv dalam

format data FASTA dan disimpan dalam *notepad* sebagai *template*. Perancangan *probe* mutan dengan program *Clone Manager Suite 9.2* dimulai dengan perancangan *probe wild-type*, yang dilakukan dengan diklik 'Primer' pada program lalu pilih 'Design' kemudian dimasukkan data *template* gen *embB* dan klik 'OK'. Kemudian pada 'Primer Type' pilih 'Probe' dan pada kolom 'Design Detail' dimasukkan panjang *probe* DNA yang divariasikan dari 18-30 basa pada bagian 'length' dan diatur daerah target yang diinginkan, lalu klik 'OK'. Selanjutnya program akan memberikan beberapa data sekuens *probe* DNA dan diklik 'Primer report' untuk menampilkan urutan nukleotida, panjang, komposisi dan kriteria dari *probe*. Urutan nukleotida yang mencakup posisi mutasi diskriminasi. Desain *probe wild-type* selanjutnya diubah menjadi desain *probe* mutan melalui penggantian basa nukleotida pada menu *direct entry*. Penggantian dilakukan agar diperoleh desain *probe* mutan yang spesifik terhadap perubahan nukleotida pada kodon kodon 306 gen *embB*.

### 3. HASIL DAN PEMBAHASAN

#### Pemilihan Sekuens Target Rancangan Probe DNA

Perancangan *probe* DNA untuk gen *embB* dilakukan pada daerah ERDR gen *embB* *M. tuberculosis*. Mutasi pada gen *embB* yang paling umum terdeteksi terjadi pada kodon 306, 406, dan 497 [13, 14, 15]. Prevalensi tertinggi mutasi gen *embB* terjadi pada kodon 306 sebesar 30-69% [6]. Mutasi pada kodon 306 menyebabkan perubahan asam amino seperti perubahan metionin menjadi valin (M306V), metionin menjadi leusin (M306L), dan metionin menjadi isoleusin (M306I). Perubahan asam amino yang paling sering terjadi adalah metionin menjadi valin. Penelitian ini akan merancang *probe* DNA mutan untuk mendeteksi mutasi M306I. Perancangan *probe* DNA mutan dilakukan menggunakan urutan nukleotida *wild-type* dari gen *embB* (*accession number*:

NC\_000962) *M. tuberculosis* H37Rv yang diperoleh dari *database National Center for Biotechnology Information (NCBI)*.

#### Hasil Perancangan Probe DNA

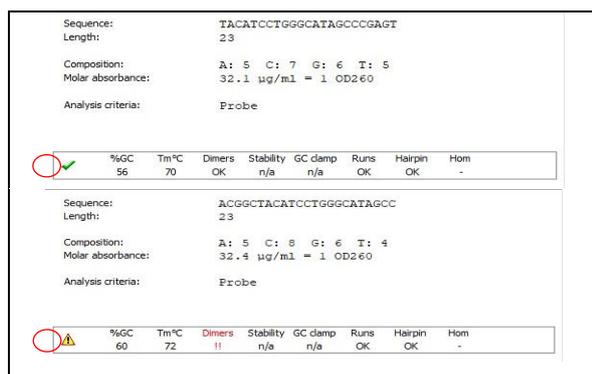
Penelitian ini menggunakan data panjang dan  $T_m$  dari primer yang dijadikan sebagai acuan untuk menentukan kriteria dari *probe* mutan yang akan dirancang. Perancangan *probe* secara *in silico* merupakan suatu teknik perancangan urutan nukleotida *probe* yang cepat dan sederhana. Suatu *probe* dapat dibuat dengan memasukkan urutan nukleotida lengkap. Program secara otomatis memberikan informasi mengenai kompatibilitas *probe* untuk target yang diinginkan, serta disajikan dalam bentuk daftar *probe* terpilih. Kriteria dari masing-masing rancangan *probe* juga dapat diperoleh lebih cepat karena secara langsung ditampilkan oleh program sesuai urutan nukleotidanya.

*Probe* mutan yang dirancang merupakan *TaqMan probe*. Jenis *probe* ini memiliki desain yang sederhana dan fluoresensinya dapat ditentukan pada akhir fase ekstensi [12]. Desain *TaqMan probe* berupa susunan oligonukleotida linear yang dilabel *reporter* pada ujung 5' dan *quencher* pada ujung 3' [16]. *TaqMan probe* bersifat spesifik sehingga dapat digunakan untuk mendeteksi satu perubahan basa pada urutan nukleotida target [17]. Perancangan *probe* mutan dengan program *Clone Manager Suite 9.2* dimulai dengan perancangan *probe wild-type*. Hasil desain *probe wild-type* yang diperoleh tidak khusus mencakup daerah target mutasi yang diinginkan. Oleh karena itu, seleksi berdasarkan cakupan daerah target dilakukan untuk memperoleh desain *probe wild-type* yang mencakup rentang daerah mutasi pada posisi 918 bp dari kodon *start*. Desain *probe wild-type* yang telah terpilih selanjutnya diubah menjadi desain *probe* mutan melalui penggantian basa nukleotida pada menu *direct entry*. Penggantian dilakukan agar diperoleh desain *probe*

mutan yang spesifik terhadap perubahan nukleotida pada kodon 306 gen *embB*.

### Hasil Analisis Rancangan DNA Probe

Analisis perancangan *probe* DNA dilakukan melalui 2 tahap yaitu analisis tahap awal sesuai dengan kriteria *probe* secara umum dan analisis tahap akhir sesuai dengan kriteria pelabelan *TaqMan probe*. Analisis tahap awal dilakukan berdasarkan kriteria *probe* secara umum yang meliputi panjang nukleotida, kandungan %GC,  $T_m$ , *runs*, *repeats*, *dimer*, dan *hairpin*. Desain yang memenuhi semua kriteria umum *probe* akan ditampilkan dengan tanda centang (✓) pada program, sedangkan *probe* yang tidak memenuhi kriteria akan ditampilkan dengan tanda peringatan (!).



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

Beberapa kriteria analisis tahap awal *probe* didasarkan pada kriteria primer yang digunakan [18]. Kriteria primer yang dijadikan acuan pada penelitian ini adalah panjang dan nilai  $T_m$  primer untuk menentukan panjang dan nilai  $T_m$  *probe*. Hal ini perlu dilakukan untuk mencegah penempelan tidak spesifik dari primer atau *probe* karena berada dalam satu reaksi yang sama selama PCR [19]. Kriteria analisis tahap awal meliputi, panjang *probe* 18-30 basa, kandungan GC 35-65%,  $T_m$  *probe* 5-10°C lebih tinggi dari  $T_m$  primer, dimer kurang dari 5 basa, tidak terbentuk hairpin, serta jumlah *runs* dan *repeats*  $\leq 4$ .

Tabel 1. Hasil Perancangan *Probe* DNA Mutan untuk Deteksi Mutasi M306I Gen *embB*

Nama Probe	Urutan Nukleotida Probe	Kriteria Desain DNA Probe Secara In Silico					
		Fje	T <sub>m</sub>	% GC	Dimer	Runs	Repeat Hairpin
Desain probe spesifik mutasi M306I							
E306M11	GCTACATCCTGGGCATAGCCCGAGT	71	60	4	3	-	-
E306M14	TACATCCTGGGCATAGCCCGAGT	23	70	56	4	3	-
E306M15	ACATCCTGGGCATAGCCGAGTC	71	60	4	3	-	-
E306M16	CTACATCCTGGGCATAGCCCGAGT	71	58	4	3	-	-
E306M17	TACATCCTGGGCATAGCCCGAGTC	24	71	58	4	3	-
E306M18	GCTACATCCTGGGCATAGCCCGAGT	73	60	4	3	-	-
E306M19	CTACATCCTGGGCATAGCCCGAGTC	25	72	60	4	3	-
E306M110	TACATCCTGGGCATAGCCCGAGTCG	73	60	4	3	-	-
E306M112	GCTACATCCTGGGCATAGCCCGAGTC	26	74	61	4	3	-
E306M113	CTACATCCTGGGCATAGCCCGAGTCG	74	61	4	3	-	-

Keterangan: Nama *probe* misalnya E306M11: E = menunjukkan gen *embB* M. *tuberculosis*; 306 = menunjukkan kodon target; M = menunjukkan jenis rancangan *probe* mutan; I = menunjukkan asam amino yang terbentuk akibat mutasi; 1 = nomor desain *probe*.

*Probe* mutan hasil desain memiliki variasi panjang 23-26 basa. *Probe* dirancang melebihi panjang primer yang digunakan. Hal ini dimaksudkan untuk memperoleh  $T_m$  *probe* yang lebih tinggi dibandingkan  $T_m$  primer untuk mencegah degradasi *probe* yang tidak efisien. Panjang *probe* yang diperoleh sudah sesuai dengan kriteria panjang *probe* yang baik yaitu berkisar 18-30 basa. *Probe* DNA yang terlalu panjang dapat menghasilkan waktu hibridisasi yang lebih lama dan kurang spesifik untuk membedakan *mismatch*. Hal ini dapat menyebabkan hasil positif palsu, khususnya ketika perbedaan di antara 2 atau lebih *probe* yang digunakan hanya terletak pada nukleotida tunggal [17]. Sedangkan *probe* yang terlalu pendek akan memiliki waktu annealing yang singkat, tetapi dapat menghasilkan spesifisitas yang rendah [20].

Kriteria kedua yaitu %GC sebesar 35-65%. *Probe* mutan hasil desain memiliki kandungan %GC dengan 56-65% sehingga masih memenuhi kriteria *probe* yang baik. 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 [18].

Semua desain *probe* mutan kemudian diseleksi berdasarkan nilai  $T_m$ . Kriteria dari *probe* yang baik yaitu memiliki  $T_m$  5-10°C lebih tinggi dari  $T_m$  primer [19].  $T_m$  *probe* mutan untuk kodon 306 gen *embB* memiliki rentang  $T_m$  72-74°C dengan  $T_m$  primer yang digunakan yaitu 62°C dan 65°C.  $T_m$  *probe* yang lebih tinggi akan menyebabkan *probe* tetap terhibridisasi dengan DNA target sebelum proses pemanjangan primer. Kompleks hibridisasi yang stabil akan menghasilkan aktivitas eksonuklease maksimum selama proses PCR. Apabila tidak terjadi proses degradasi *probe* yang efisien, maka amplifikasi dalam PCR dapat berlangsung, tetapi amplicon tidak akan terdeteksi [21].

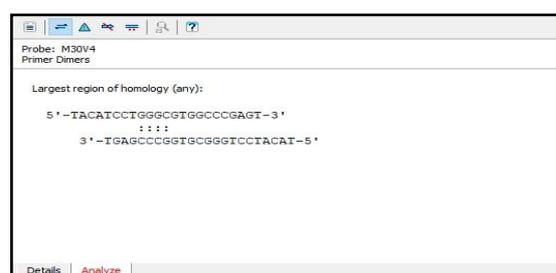
*Probe* mutan selanjutnya dianalisis berdasarkan jumlah *runs*, *repeats*, dan *hairpins*. Jumlah *runs* dari seluruh desain *probe* DNA mutan yang diperoleh yaitu tidak lebih dari 4 basa dan tidak memiliki *repeats* dan *hairpins*. Jumlah *runs* dan *repeats* yang dapat diterima sebagai *probe* yang baik yaitu tidak lebih dari 4. *Probe* DNA sebaiknya harus menghindari *runs* nukleotida yang sama, khususnya *runs* basa G sebanyak 4 atau lebih untuk mencegah terbentuknya struktur sekunder [11]. *Probe* DNA juga tidak boleh memiliki *hairpins* karena dapat menghambat proses hibridisasi *probe* pada DNA target [16].



**Gambar 3.** Tampilan hasil analisis *runs*, *repeats*, dan *hairpins* pada program *Clone Manager Suite 9.2*.

Analisis struktur sekunder selain *hairpins* adalah dimer. Adanya dimer pada *probe* dapat mengurangi efisiensi hibridisasi sehingga menimbulkan

penurunan sensitivitas deteksi [18]. Dimer ditemukan sebanyak 4 basa pada seluruh sekuens *probe*. Dimer yang terbentuk merupakan *dimers any* yaitu dimer yang terbentuk pada daerah selain 3'. Pada program *Clone Manager Suite 9.2* kriteria *dimers any* yang diperbolehkan yaitu tidak melebihi 5 basa homolog, sehingga hasil perancangan *probe* dengan 4 *dimers any* masih memenuhi kriteria *probe* yang baik. Dimer dibentuk oleh interaksi intermolekuler antara dua *probe* [22]. Contoh tampilan dimer dapat dilihat pada Gambar 4.



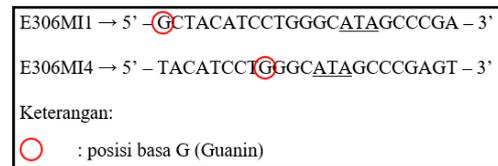
**Gambar 4.** Tampilan hasil analisis dimer pada program *Clone Manager Suite 9.2*.

Desain-desain *probe* mutan terpilih pada analisis tahap awal kemudian dianalisis berdasarkan kriteria pelabelan *TaqMan probe*. *TaqMan probe* merupakan salah satu jenis *probe* hidrolisis yang bekerja melibatkan aktivitas eksonuklease 5'→3' *Taq* DNA *polymerase*. Aktivitas 5' eksonuklease dari enzim polimerase akan memecah *probe* sehingga FRET tidak terjadi lagi dan dihasilkan sinyal fluoresensi. Fluoresensi akan semakin meningkat sebanding dengan peningkatan pemecahan *probe* [11]. *TaqMan probe* diberi label dengan dua pewarna fluoresensi yang memancarkan pada panjang gelombang yang berbeda. Label *TaqMan probe* terdiri dari *reporter* yang melekat pada ujung 5' dan *quencher* pada ujung 3' [23]. Kriteria pertama dari pelabelan *TaqMan probe* yaitu tidak terdapat basa Guanin (G) pada posisi pertama dan kedua dari ujung 5' [11]. Basa G tidak dianjurkan berada pada ujung 5' karena basa G merupakan *quencher* yang dapat

memadamkan fluoresens dari *reporter* [24]. Kemampuan basa G mengabsorpsi fluoresensi terjadi melalui tranfer elektron yang diinduksi cahaya [25]. Berdasarkan kriteria tersebut, diperoleh 7 *probe* yaitu *probe* E306MI4, E306MI5, E306MI6, E306MI7, E306MI9, E306MI10, dan E306MI13 untuk mutasi M306I gen *embB*. Kriteria kedua yaitu *probe* mengandung jumlah basa sitosin (C) lebih banyak atau sama dengan basa G [11]. Jumlah dan posisi basa G sangat perlu dipertimbangkan agar diperoleh efisiensi sinyal deteksi yang optimal. Basa G dapat mengganggu FRET dengan kemampuan donor elektron yang kuat. Struktur basa G mengandung paling banyak atom dengan sifat elektronegatif yang dapat menyumbangkan pasangan elektron bebas. Hal ini menyebabkan kemampuan donor elektron basa G paling besar dibandingkan basa nukleotida lain [26]. Setelah diseleksi kembali, *probe* yang memenuhi kriteria pelabelan *TaqMan probe* yaitu *probe* E306MI4, E306MI5, E306MI6, E306MI7, E306MI9, E306MI10, dan E306MI13 untuk gen *embB*. Untuk mendeteksi mutasi M306I direkomendasikan menggunakan *probe* E306MI4 karena memiliki panjang, %GC, dan  $T_m$  yang lebih rendah serta tidak mengandung *repeats*, sehingga *probe* mutan dapat terhibridisasi dengan lebih baik.

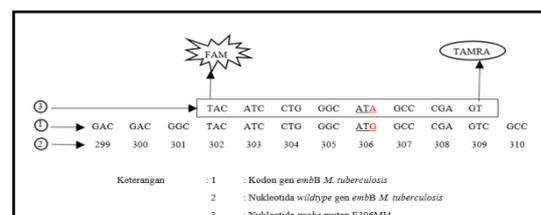
*Probe* yang telah memenuhi kriteria pelabelan *TaqMan probe* dapat ditempelkan label yang terdiri dari *reporter* dan *quencher*. Label yang biasanya digunakan untuk *TaqMan probe* adalah FAM sebagai *reporter* dan TAMRA sebagai *quencher* [18, 19]. *Reporter* FAM merupakan label pewarna donor dengan signal fluoresen kuat yang memonitoring hasil amplifikasi di setiap siklus PCR dengan berikatan spesifik dengan *probe* DNA [18]. Sedangkan, TAMRA dipilih sebagai *quencher* karena label ini kompatibel dengan FAM dan memiliki panjang gelombang absorpsi pada 558 nm yang tumpang tindih dengan panjang

gelombang emisi FAM pada 517 nm sehingga FRET tidak lagi terjadi [19, 27].



**Gambar 5.** Posisi basa G pada *probe* E306MI1 tidak memenuhi kriteria dan E306MI4 memenuhi kriteria pelabelan *TaqMan probe*

Label *reporter* dan *quencher* ditempelkan pada ujung berlawanan pada nukleotida *probe* mutan. *Reporter* direkomendasikan agar dilekatkan pada basa C atau T. Sedangkan *quencher* ditempelkan pada ujung 3' atau di posisi sentral dari oligonukleotida dan dapat ditempel pada semua nukleotida [21, 28]. Pada pemasangan label, jarak optimal antara dua label perlu dipertimbangkan untuk memperoleh efisiensi pemataman label *reporter* yang baik. *Quencher* sebaiknya memiliki jarak 3-30 nukleotida dari *reporter*. *Quencher* pada jarak 2 basa dari *reporter* akan mengakibatkan enzim *Taq polymerase* tidak mampu melakukan aktivitas eksonuklease yang berperan dalam degradasi *probe* untuk menghasilkan sinyal fluoresensi. Apabila jarak antara *reporter* dengan *quencher* terlalu jauh maka *quencher* tidak dapat dengan cukup menerima tranfer energi dari *reporter* sebelum *reporter* terlepas dari sekuens, sehingga proses deteksi tidak dapat berlangsung dengan baik [28, 29].



**Gambar 6.** Pelabelan desain *probe* mutan E306MI4 yang spesifik terhadap perubahan A → G pada kodon 306 pada gen *embB*.

Pemasangan label pada desain *probe* mutan E306MI4, label *reporter* FAM ditempelkan pada basa C di ujung 5', sedangkan label *quencher* TAMRA ditempelkan pada basa T di ujung 3'.

Desain *TaqMan probe* yang dihasilkan dapat digunakan secara spesifik untuk mendeteksi mutasi M306I pada gen *embB*. Hasil perancangan *TaqMan probe* secara *in silico* perlu dilakukan pengujian lebih lanjut secara eksperimental di laboratorium untuk membuktikan bahwa hasil rancangan *TaqMan probe* mampu mendeteksi adanya mutasi pada kodon 306 gen *embB M. tuberculosis* dengan metode RT-PCR.

#### 4. KESIMPULAN

Terdapat 7 *probe* (E306MI4, E306MI5, E306MI6, E306MI7, E306MI9, E306MI10, dan E306MI13) untuk deteksi spesifik mutasi M306I pada gen *embB*. *Probe* E306MI4 dengan urutan 5'-FAM-TAC ATC CTG GGC ATA\_GCC CGA GT-TAMRA-3' direkomendasikan untuk digunakan dalam deteksi mutasi M306I pada gen *embB* untuk memperoleh hibridisasi *probe* yang lebih baik.

#### 5. DAFTAR PUSTAKA

- [1] World Health Organization (WHO). 2018. *Global Tuberculosis Report*, World Health Organization, Geneva.
- [2] Cheng, S., Cui, Z., Li, Y., and Hu, Z. 2014. Diagnostic Accuracy of a Molecular Drug Susceptibility Testing Method for the Antituberculosis Drug Ethambutol: a Systematic Review and Meta-Analysis, *Journal of Clinical Microbiology*, **52**: 2913-2924.
- [3] Moure, R., Español, M., Tudó, G., Vicente, E., Coll, P., Martin, J.G., Mick, V., Salvadó, M., and Alcaide, F. 2013. Characterization of the *embB* gene in *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Barcelona and rapid detection of main mutations related to ethambutol resistance using a low-density DNA array. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **69** : 947-954
- [4] Li, Y., Wang, Y., Zhang, Z., Gao, H., Wang, H., Cao, J., Zhang, S., Liu, Y., Lu, J., Xu, Z., and Daia, E., 2016. Association between *embB* Codon 306 Mutations, Phenotypic Resistance Profiles, and Genotypic Characterization in Clinical *Mycobacterium tuberculosis* Isolates from Hebei, China, *Antimicrobial Agents and Chemotheramy*, **60**: 7295-7301.
- [5] Mohammadi, B., Mohajeri, P., Rouhi, S., and Ramazanzadeh, R., 2018. The relationship between *embB*306 and *embB*406 mutations and ethambutol resistant in *Mycobacterium tuberculosis* isolated from patients in west of Iran, *Medical Journal of the Islamic Republic of Iran*, **32**: 1-4.
- [6] Rezaei, F.M., Haeili, P., Mohajeri, A.H., Shahraki, Fooladi, A.I., Zahednamazi, F., Feizabadi, M., 2016. Frequency of mutational changes in the *embB* among the ethambutol resistant strains of *Mycobacterium tuberculosis* in Iran, *The Journal of Infection in Developing Countries*, **10**: 363-368.
- [7] Bakula, Z., Napiorkowska, A., Bielecki, J., Kopec, E.A., Zwolska, Z., and Jagielski, T., 2013. Mutations in the *embB* Gene and Their Association with Ethambutol Resistance in Multidrug-Resistant *Mycobacterium tuberculosis* Clinical Isolates from Poland, *BioMed Research International*.
- [8] Cordoba, B.C., Eusebio, D.M.J., Velasco, R.A., Salazar, R.M., Laborin, R.L., and Cuevas, R.Z., 2015. Mutation at *embB* Codon 306, a Potential Marker for the Identification of Multidrug Resistance Associated with Ethambutol in *Mycobacterium tuberculosis*, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **59**: 5455-5462.
- [9] Zhang, H., Chen, X., Wang, Z., Ren, Z., Wu, J., Sun, H. and Bai, X., 2015.



- Pyrosequencing analysis for mutations in *embB* codon306 among clinical *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Qingdao, China. *Int J Clin Exp Med*. **8** : 11276-11282.
- [10] Chou, C., Chen, C.H., 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
- [11] McPherson, M and Moller, S., 2006. PCR Edisi 2, Taylor & Francis Group, New York.
- [12] Navarro, E., Heras, G.S., Castano and Solera, J., 2015. Real-Time PCR Detection Chemistry, *Clinica Chimica Acta*, **439**: 231-250.
- [13] Zhao, L., Sun, Q., Liu, H., Xiao, T., Zhao, X., Li, G., Jiang, Y., Zeng, C., Wan, K., 2015. Analysis of *embCAB* Mutations Associated with Ethambutol Resistance in Multidrug-Resistant *Mycobacterium tuberculosis* Isolates from China, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **59**: 2045-2050.
- [14] Sun, Q., Xiao, T., Liu, H., Zhao, X., Liu, Z., Li, Y., Zeng, H., Zhao, L., and Wan, K., 2018. Mutations within *embCAB* Are Associated with Variable Level of Ethambutol Resistance in *Mycobacterium tuberculosis* Isolates from China, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **62**: 1-8.
- [15] Khosravi, A.D., Meghdadi, H., Ghadiri, A., Alami, A., Sina, A.H., Mirsaeidi, M., 2018. *rpoB* gene mutations among *Mycobacterium tuberculosis* isolates from extrapulmonary sites. *Journal of Pathology, Microbiology and Immunology*, **126**: 241-247.
- [16] Walker, J.M. dan Rapley, R., 2008. *Medical Biomethods Handbook*, Humana Press, Totowa, New Jersey.
- [17] 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.
- [18] Dorak, M.T. 2006, *Real-Time PCR*, Taylor and Francis Group, New York.
- [19] Anonim, 2006. *Real-Time PCR Application Guide*, Bio-Rad Laboratories Inc, USA.
- [20] Walker, J.M. and Rapley, R., 2005. *Medical Biomethods Handbook*, Humana Press, Totowa, New Jersey.
- [21] 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
- [22] Borah, P., 2011. Primer Designing for PCR, *Science Vision*, **11** : 134-136.
- [23] Butler, J.M. 2011, *Advanced topics in forensic DNA typing: methodology*, Academic press, USA.
- [24] Johansson, M.K., 2006. Choosing Reporter-Ouencher Pairs for Efficient Quenching Through Formation of Intramolecular *Dimers*, *Methods in Molecular Biology*, **335**: 17-29.
- [25] Murray, J. L., Hu, P., dan Shafer D. A., 2014. Seven Novel *Probe* System for RealTime PCR Provide Absolute Single-Base Discrimination, Higher Signaling, and Generic Components, *The Journal of Molecular Diagnostics*, **16**: 627-638.
- [26] Nazarenko, I., Pires, R., Lowe, B., Obaidy, M., dan Rashtchian, A., 2002. Effect of Primary and Secondary Structure of Oligodeoxyribonucleotides on The Fluorescent Properties of Conjugated Dyes. *Nucleic Acids Research*, **30**: 2089-2195.
- [27] Didenko, V. V. 2006. *Fluorescent Energy Transfer Nucleic Acid Probe Design and Protocols*. Humana Press Inc, Totowa, New Jersey. 17-80.
- [28] Livak, K. J., Flood S. J. A., Marmaro, J., Giusti, W., dan Deetz, K., 1995. Oligonucleotides With Fluorescent Dyes At Opposite Ends Provide A Quenched *Probe* System Useful For

Detecting PCR Product and Nucleic Acid Hybridization. *Genome Research*. 4: 357-362.

- [29] Marras, S.A., 2006. 'Selection of fluorophore and quencher pairs for fluorescent nucleic acid hybridization probes' in Didenko, *Fluorescent energy transfer nucleic acid probes*, Humana Press, Totowa, pp 3-16.