
JURNAL METAMORFOSA
Journal of Biological Sciences
ISSN: 2302-5697
<http://ojs.unud.ac.id/index.php/metamorfosa>

DESAIN TAQMAN PROBE SECARA *IN SILICO* SEBAGAI PENDETEKSI MUTASI PADA KODON 516 GEN *rpoB* *Mycobacterium tuberculosis* UNTUK METODE REAL-TIME PCR

***IN SILICO* TAQMAN PROBE DESIGN AS A MUTATION DETECTOR ON CODON 516 OF *rpoB* *Mycobacterium tuberculosis* GENE FOR THE REAL-TIME PCR METHOD**

Dek Pueteri Dewi Suryani^{1*}, Putu Sanna Yustiantara^{1,2}, Sagung Chandra Yowani^{1,2}

¹Jurusan Farmasi FMIPA, ²Kelompok Studi MDR-TB & XDR-TB
FMIPA, Universitas Udayana, Bukit Jimbaran, Bali-Indonesia, 80361

*Email: dektrie12@gmail.com

INTISARI

Penelitian ini bertujuan untuk mendesain *TaqMan probe* secara *in silico*. Desain *TaqMan probe* dilakukan dengan menggunakan *software Clone Manager Suite 6*. Sekuens DNA yang digunakan sebagai *template* yaitu gen *rpoB* *M. tuberculosis* H37Rv (*accession number* U12205.1). Pada studi ini, diperoleh desain *TaqMan probe* sebanyak 8 sekuens, yaitu R516MV-2, R516MV-3, R516MV-4, R516MV-5, R516MV-7, R516MV-8, R516MV-11, R516MV-13. Desain yang diperoleh telah memenuhi kriteria *TaqMan probe*, meliputi panjang *probe* (23-28 nukleotida), nilai *Tm* (72°C), %GC (50-58%), *runs* dan *repeats* (≤ 4 basa), struktur *dimer* yang sesuai dengan persyaratan dan tidak terbentuk struktur *hairpin*. Selain itu, sekuens tersebut juga telah memenuhi kriteria pelabelan yang meliputi letak basa G berada di urutan ketiga dari ujung 5' dan jumlah basa C lebih banyak daripada basa G. Sehingga sekuens tersebut dapat dilabel menggunakan label FAM (reporter) pada ujung 5' dan label TAMRA (quencher) pada ujung 3'. *Probe* yang didesain telah sesuai dengan kriteria *TaqMan probe*. Sehingga *probe* tersebut dapat ditargetkan untuk mendeteksi mutasi pada kodon 516 dengan perubahan asam aspartat menjadi valin (GAC → GTC) menggunakan metode *real-time* PCR.

Kata Kunci: Gen rpoB, In Silico, TaqMan Probe, Real-time PCR.

ABSTRACT

The aim of this research was to *in silico* design of *TaqMan probe*. Design of *TaqMan probe* were conducted using *software Clone Manager Suite 6*. As a *template*, the *rpoB* gene of *M. tuberculosis* H37Rv (*accession number* U12205.1) was used. The results of this research were 8 sequences such as, R516MV-2, R516MV-3, R516MV-4, R516MV-5, R516MV-7, R516MV-8, R516MV-11, R516MV-13. These sequences were met the criteria of *TaqMan probe*, such as length of nucleotide (23-28 nucleotide), *Tm* value (72°C), %GC (50-58%), *runs* and *repeats* (≤ 4 bases), *dimer* structure in accordance to the requirements and does not form *hairpin* structures. In addition, these sequences were met labeling criteria of *TaqMan probe* which are including the location of G bases and the number of G-C bases in sequences. Therefore, these sequences could be labeled by FAM (reporter) at 5' end and TAMRA (quencher) at 3' end. The conclusion of this research, the sequences were met the criteria of *TaqMan probe*. Therefore, it could be targeted to detect mutations at codon 516 with a change of aspartic acid into valine (GAC → GTC) by using *real-time* PCR method.

Keywords: rpoB gen, In Silico, TaqMan Probe, Real-time PCR.

PENDAHULUAN

Tuberkulosis (TB) merupakan penyakit infeksi yang disebabkan oleh *Mycobacterium tuberculosis*. Penyakit ini masih menjadi suatu ancaman bagi penduduk Indonesia karena dapat menyebabkan kematian. Pada tahun 2014 diperkirakan Indonesia mengalami sejumlah peningkatan kasus TB dibandingkan perkiraan sebelumnya, yaitu sejumlah 1 juta kasus pertahunnya. Indonesia merupakan salah satu dari 3 negara yang menyumbang sejumlah 43% kasus global pada tahun 2014 (WHO, 2015).

Terapi tuberkulosis dilakukan dengan pemberian obat antituberkulosis (OAT) yang tepat. Namun belakangan ini ditemukan adanya galur dari *Mycobacterium tuberculosis* yang mengalami resisten terhadap beberapa jenis OAT. Galur ini disebut galur *Multi Drug Resistant TB* (MDR-TB). MDR-TB merupakan resistensi terhadap setidaknya 2 jenis OAT lini pertama yang efektif yaitu isoniazid dan rifampisin (WHO, 2015). Di Indonesia, kasus MDR-TB terjadi sebanyak 6800 kasus baru pertahunnya (Kementrian Kesehatan RI, 2015).

Rifampisin bekerja dengan cara menghambat sintesis RNA dari *M. tuberculosis*, yaitu dengan mengikat sub unit β RNA polimerase. Resistensi rifampisin terjadi karena adanya mutasi pada sub unit β RNA polimerase yang mengkode gen *rpoB*. Hal ini akan mengakibatkan kerja rifampisin tidak optimal, sehingga *M. tuberculosis* menjadi resisten (Katzung, 2006; Sun *et al.*, 2009; Silva dan Palomina, 2011).

Strain M. tuberculosis yang resisten terhadap rifampisin mengalami mutasi sebanyak 96,1% pada daerah 81pb, yang juga dikenal dengan daerah *Rifampicin Resistant Determining Region* (RRDR). Wilayah RRDR mencakup kodon 507-533. Dari penelitian yang telah dilakukan, mutasi yang terjadi pada daerah tersebut menunjukkan level resistensi tertinggi (Ramaswamy dan Musser, 1998; Comas *et al.*, 2012). Salah satu titik mutasi mayor yang berkorelasi dengan resistensi rifampisin adalah kodon D516V (Sun *et al.*, 2009). Studi yang dilakukan untuk identifikasi isolat di beberapa negara Asia menyatakan bahwa frekuensi mutasi

tertinggi untuk kodon 516 di Asia sebanyak 14,4%. Pada penelitian terbaru yang dilakukan di Bali juga ditemukan adanya mutasi pada kodon 516 (Pradnyaniti, 2013).

Untuk mengatasi resistensi pada kasus MDR-TB, maka diperlukan suatu metode deteksi molekular yang cepat dan dapat mendeteksi mutasi secara spesifik, sehingga pasien akan memperoleh terapi yang tepat. Metode deteksi molekular yang digunakan yaitu *real-time* PCR, dengan keunggulannya dapat mendeteksi patogen secara kualitatif maupun kuantitatif (Ramirez *et al.*, 2010; Siregar *et al.*, 2012). Pada metode *real-time* PCR dibutuhkan DNA *probe* yang dapat mendeteksi mutasi secara spesifik dengan adanya label fluoresen, yaitu pada ujung 5' dan ujung 3'. Label pada ujung 3' disebut *reporter* dan label pada ujung 5' disebut *quencher*. Pemilihan DNA *probe* pada metode *real-time* PCR merupakan langkah awal untuk memperoleh *probe* terbaik agar dapat mendeteksi mutasi secara spesifik. DNA *probe* yang digunakan yaitu jenis *TaqMan* dan akan dirancang secara *in silico* dengan bantuan *software Clone Manager Suite 6* (Ram *et al.*, 2008). Oleh karena itu, pada penelitian ini bertujuan untuk mendesain *TaqMan probe* yang akan digunakan pada metode *real-time* PCR. *Probe* tersebut diharapkan dapat mendeteksi mutasi dengan perubahan asam aspartat menjadi valin (GAC→GTC) secara spesifik pada kodon 516 gen *rpoB Mycobacterium tuberculosis* untuk metode *real-time* PCR.

BAHAN DAN METODE

Gen *rpoB M. tuberculosis H37Rv*

Gen *rpoB M. tuberculosis H37Rv* (*accession number* U12205.1) yang diunduh dari situs URL:// www.ncbi.nlm.nih.gov, digunakan sebagai *template* untuk mendesain *TaqMan probe*. Selain itu, rincian data dari sepasang *primer* yang akan digunakan juga diperlukan dalam perancangan *probe*. Rincian data sepasang *primer* yang digunakan sebagai dasar penyusunan *TaqMan probe*, meliputi panjang nukleotida *primer* 22 nukleotida dan nilai *Tm primer* 67°C. *Primer* yang digunakan memiliki urutan *primer forward* 5'-GTC GAC GCT GAC CGA AGA AGA C-3' dan *primer reverse* 5'-GAG CCG ATC

AGA CCG ATG TTG G-3'. Sepasang *primer* tersebut dirancang secara *in silico* dan telah dioptimasi pada penelitian yang dilakukan oleh Pradnyaniti (2013).

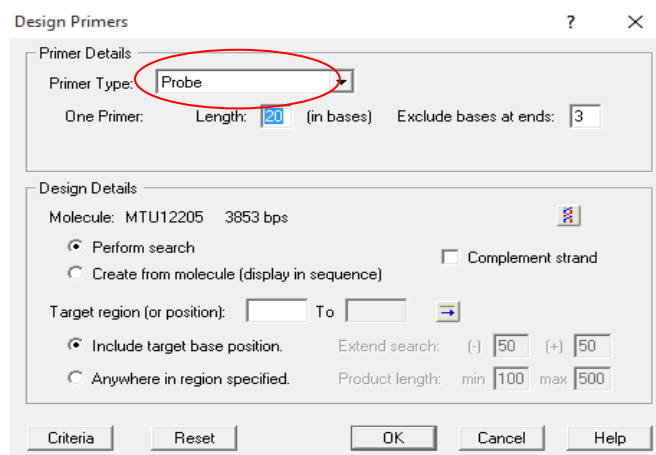
Software Dalam Desain *TaqMan probe*

Pada penelitian ini, perancangan *TaqMan probe* dilakukan secara *in silico* menggunakan *software Clone Manager Suite 6*. Daerah target perancangan *TaqMan probe* pada daerah RRDR gen *rpoB M. tuberculosis* spesifik kodon 516.

Prosedur Kerja *Software Clone Manager Suite 6*

Langkah-langkah dalam mendesain *TaqMan probe* diawali dengan membuka

software Clone Manager Suite 6, pada ikon **File** klik **Open...** lalu masukkan sekuens DNA *M. tuberculosis* gen *rpoB M. tuberculosis*. Setelah sekuens dimasukkan, pada ikon **Primer** dipilih **Design...**, maka akan muncul **Design Primers** pada menu bar. Pada *Design Primer*, ganti '*primer type*' dengan '*probe*' yang ditunjukkan pada lingkaran merah (Gambar 1), lalu dimasukkan panjang DNA *probe* (23-30 nukleotida) yang sesuai dengan kriteria *probe TaqMan* dan daerah target yang diinginkan. Pada kolom '*criteria*', dilakukan penyetingan ulang berdasarkan kriteria *TaqMan probe* yaitu nilai *Tm* 72°C, %GC 40-60%, jumlah *runs* dan *repeats* <4 basa, setelah itu klik 'OK'.



Gambar 1. Menu Input *Design Probe*

Software akan memberikan beberapa pilihan sekuens *TaqMan probe*, serta hasil analisis untuk membantu dalam menentukan desain *TaqMan probe* sesuai kriteria. Setelah memperoleh beberapa pilihan sekuens *wildtype*, maka dilakukan perancangan *probe* mutan untuk mendeteksi mutasi pada kodon 516 dengan mengubah mutasi yang sesuai pada kodon tersebut. Setelah mendapatkan sekuens mutan, maka dilakukan analisis pada masing-masing sekuens. Hasil analisis dilihat dengan menggunakan '*primer report*' dengan cara klik **Primer**, pilih **Direct Entry...** lalu tulis nama *TaqMan*

probe dan ganti '*primer type*' dengan '*probe*', selanjutnya masukkan sekuens mutan *TaqMan probe*.

HASIL

Dalam perancangan *probe*, membutuhkan data kriteria *primer* yang telah dirancang menggunakan *software Clone Manager Suite 6* dan telah dioptimasi sebelumnya pada penelitian yang dilakukan Pradnyaniti (2013). Hasil rancangan *probe* yang diperoleh menggunakan *template* gen *rpoB M. tuberculosis wildtype* dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Sekuens *Wildtype* yang Dihasilkan Pada *Software Clone Manager Suite 6*

Nama Probe	Urutan Nukleotida Probe 5'→3'	Kriteria Desain DNA Probe Secara <i>In Silico</i>						
		Pjg	Tm	%GC	Dimer	Hairpin	Runs	Repeats
R516WT-1	TGGACCAGAACAACCCGCTGTCG	23	72	60	3	-	3	-
R516WT-2	TCATGGACCAGAACAACCCGCTGT	24	72	54	4	-	3	-
R516WT-3	ATGGACCAGAACAACCCGCTGTCG	24	72	58	3	-	3	-
R516WT-4	TTCATGGACCAGAACAACCCGCTGT	25	72	52	4	-	3	-
R516WT-5	TCATGGACCAGAACAACCCGCTGTC	25	72	56	4	-	3	-
R516WT-6	GCCAATTCATGGACCAGAACAACCCG	26	72	53	4	-	3	-
R516WT-7	CCAATTCATGGACCAGAACAACCCGC	26	72	53	4	-	3	-
R516WT-8	ATTCATGGACCAGAACAACCCGCTGT	26	72	50	4	-	3	-
R516WT-9	GAGCCAATTCATGGACCAGAACAACCC	27	72	51	4	-	3	-
R516WT-10	CAATTCATGGACCAGAACAACCCGCTG	27	72	51	4	-	3	-
R516WT-11	AGCTGAGCCAATTCATGGACCAGAACA	27	72	48	4	-	2	-
R516WT-12	GCTGAGCCAATTCATGGACCAGAACA	27	72	48	4	-	2	-
R516WT-13	CTGAGCCAATTCATGGACCAGAACAAC	28	72	50	4	-	2	-
R516WT-14	GCTGAGCCAATTCATGGACCAGAACAAC	28	72	50	4	-	2	-

Keterangan: ^{R)} Menunjukkan gen *rpoB M. tuberculosis*, ^{WT)} Menunjukkan sekuens *wildtype*, ¹⁻¹⁴⁾ Menunjukkan jumlah sekuens

Tabel 1, menunjukkan bahwa terdapat 14 sekuens *wildtype* yang dihasilkan oleh *software Clone Manager Suite 6*. Sekuens *wildtype* tersebut akan didesain kembali dengan cara mengubah nukleotida *probe wildtype* sesuai

dengan mutasi yang terjadi pada kodon 516 (GAC→GTC), yaitu asam aspartat (D) menjadi valin (V). Sekuens mutan yang telah dirancang berdasarkan mutasi pada kodon 516 dapat dilihat pada Tabel 2.

Tabel 2. Sekuens Mutan yang Dirancang untuk Kodon 516

Nama Probe	Urutan Nukleotida Probe 5'→3'	Kriteria Desain DNA Probe Secara <i>In Silico</i>						
		Pjg	Tm	%GC	Dimer	Hairpin	Runs	Repeats
Desain <i>probe</i> Mutan untuk Mutasi D516V (GAC→GTC)								
R516MV-1	TGG GTC CAGAACAACCCGCTGTCG	23	72	60	3	-	3	-
R516MV-2	TCATGG GTC CAGAACAACCCGCTGT	24	72	54	4	-	3	-
R516MV-3	ATGG GTC CAGAACAACCCGCTGTCG	24	72	58	3	-	3	-
R516MV-4	TTCATGG GTC CAGAACAACCCGCTGT	25	72	52	4	-	3	-
R516MV-5	TCATGG GTC CAGAACAACCCGCTGTC	25	72	56	4	-	3	-
R516MV-6	GCCAATTCATGG GTC CAGAACAACCCG	26	72	53	4	-	3	-
R516MV-7	CCAATTCATGG GTC CAGAACAACCCGC	26	72	53	4	-	3	-
R516MV-8	ATTCATGG GTC CAGAACAACCCGCTGT	26	72	50	4	-	3	-
R516MV-9	GAGCCAATTCATGG GTC CAGAACAACCC	27	72	51	4	-	3	-
R516MV-10	CAATTCATGG GTC CAGAACAACCCGCTG	27	72	51	4	-	3	-
R516MV-11	AGCTGAGCCAATTCATGG GTC CAGAACA	27	72	48	4	-	2	-
R516MV-12	GCTGAGCCAATTCATGG GTC CAGAACA	27	72	48	4	-	2	-
R516MV-13	CTGAGCCAATTCATGG GTC CAGAACAAC	28	72	50	4	-	2	-
R516MV-14	GCTGAGCCAATTCATGG GTC CAGAACAAC	28	72	50	4	-	2	-

Keterangan: ^{R)} Menunjukkan gen *rpoB M. tuberculosis*, ^{MT)} Menunjukkan sekuens Mutan, ¹⁻¹⁴⁾ Menunjukkan jumlah sekuens, ^{V)}Asam amino valin yang terbentuk akibat terjadinya mutasi pada kodon 516.

Tabel 2, menunjukkan hasil rancangan desain *probe* mutan yang selanjutnya akan dianalisis berdasarkan kriteria *TaqMan probe*. Sekuens *probe* yang memenuhi kriteria *TaqMan*

probe untuk dapat mendeteksi perubahan asam aspartat menjadi valin pada kodon 516 diperoleh sebanyak 8 sekuens (Tabel 3).

Tabel 3. Sekuens *TaqMan probe* Terpilih Untuk Mendeteksi Mutasi Pada Kodon 516

Nama Probe	Urutan Nukleotida Probe 5'→3'	Kriteria Desain DNA Probe Secara <i>In Silico</i>						
		Pjg	Tm	%GC	Dimer	Hairpin	Runs	Repeats
Desain <i>probe</i> Mutan untuk Mutasi D516V (GAC→GTC)								
R516MV-2	TCATGG GTC CAGAACAACCCGCTGT	24	72	54	4	-	3	-
R516MV-3	ATGG GTC CAGAACAACCCGCTGTCG	24	72	58	3	-	3	-
R516MV-4	TTCATGG GTC CAGAACAACCCGCTGT	25	72	52	4	-	3	-
R516MV-5	TCATGG GTC CAGAACAACCCGCTGTC	25	72	56	4	-	3	-
R516MV-7	CCAATTCATGG GTC CAGAACAACCCGC	26	72	53	4	-	3	-
R516MV-8	ATTCATGG GTC CAGAACAACCCGCTGT	26	72	50	4	-	3	-
R516MV-11	CAATTCATGG GTC CAGAACAACCCGCTG	27	72	51	4	-	3	-
R516MV-13	CTGAGCCAATTCATGG GTC CAGAACAAC	28	72	50	4	-	2	-

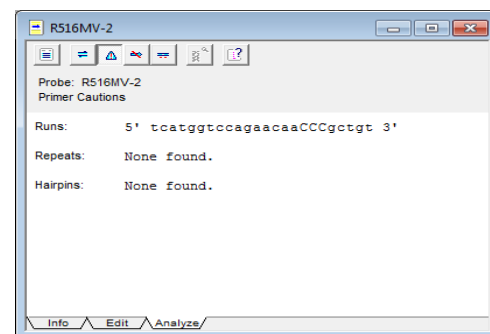
Keterangan: ^{R)} Menunjukkan gen *rpoB M. tuberculosis*, ^{MT)} Menunjukkan sekuens mutan, ^{V)}Asam amino valin yang terbentuk akibat terjadinya mutasi pada kodon 516.

PEMBAHASAN

Beberapa kriteria yang dipersyaratkan oleh *TaqMan probe* meliputi, panjang *probe*, nilai T_m , kandungan %GC, jumlah *runs* dan *repeats*, serta tidak adanya struktur *hairpin* dan *dimer*. Analisis akan dilanjutkan untuk kriteria pelabelan berdasarkan persyaratan *TaqMan probe*. Pelabelan yang baik ditentukan oleh kriteria letak basa G di ujung 5' dan jumlah basa G-C pada sekuens mutan. Hasil analisis *probe* terpilih yang telah memenuhi kriteria untuk *TaqMan probe* dapat dilihat pada Tabel 3.

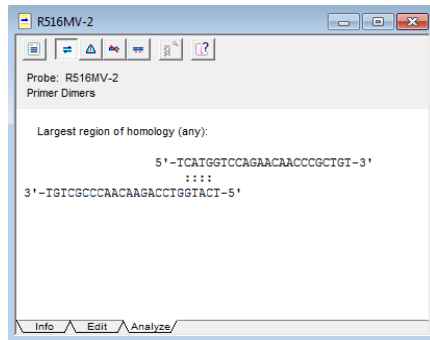
Tabel 3, menunjukkan hasil desain *TaqMan probe* terpilih untuk mendeteksi mutasi pada kodon 516. Masing-masing *probe* telah memenuhi kriteria panjang yang dipersyaratkan, yaitu lebih panjang daripada *primer* (22 nukleotida) yang akan digunakan, yaitu 23-28 nukleotida. Untuk kriteria nilai T_m masing-masing sekuens juga telah sesuai dengan nilai T_m yang dipersyaratkan *TaqMan probe* (5-10°C), yaitu 72°C. Nilai T_m tersebut lebih tinggi 5°C dibandingkan nilai T_m *primer* yang digunakan yaitu 67°C. Nilai T_m *probe* yang lebih tinggi tersebut jika dibandingkan nilai T_m *primer* akan membantu *probe* terhibridisasi sempurna pada target DNA selama proses ekstensi berlangsung (Bio-Rad Laboratories, 2006; Mcpherson dan moller, 2006). Selain itu, nilai T_m juga akan dipengaruhi oleh kandungan %GC, jika kandungan %GC tinggi akan menyebabkan nilai T_m menjadi lebih tinggi dari yang ditentukan secara experimental. Bila kandungan %GC tinggi, maka akan terjadi peningkatan hirbridisasi non-spesifik pada sekuens, yang menghasilkan sinyal non-spesifik, sehingga dapat mempengaruhi proses PCR. Untuk seluruh sekuens yang diperoleh, telah memenuhi kandungan %GC sesuai persyaratan *TaqMan probe*, yaitu masih dalam rentang 40-60% (Applied Biosystems, 2005; Walker dan Rapley, 2005). Pada seluruh sekuens terpilih, untuk kriteria *runs*, *repeats* dan *hairpin* telah sesuai dengan persyaratan *TaqMan probe*. *Runs* tidak melebihi 4 basa serta tidak ditemukannya *repeats* dan struktur *hairpin* pada sekuens (Borah, 2011). *Runs* adalah pengulangan basa yang terjadi secara berturut-turut dalam untai DNA, sedang *repeats* adalah pengulangan

yang terjadi di nukleotida yang sama secara berturut-turut dalam untai DNA (Borah, 2011). *Runs* yang melebihi 4 basa khususnya basa G-C akan menyebabkan *misspriming*. Selain itu akan terbentuk struktur sekunder yang disebabkan karena terlipatnya oligonukleotida satu sama lain, sehingga menghasilkan puncak ganda pada proses deteksi (Applied Biosystems, 2005; McPherson dan Moller, 2005). Contoh analisis *runs*, *repeats* dan *hairpin* pada salah satu sekuens dapat dilihat pada Gambar 3.



Gambar 3. Contoh Analisis *Runs*, *Repeats* dan *Hairpin* Pada Salah Satu Sekuens

Hairpin merupakan struktur sekunder yang terbentuk karena interaksi intramolekular pada sekuens, yang dapat menghalangi *probe* terhibridisasi pada target DNA (Borah, 2011). Sebaiknya struktur *hairpin* harus dihindari, karena dapat mempengaruhi spesifisitas rancangan *TaqMan probe*. Struktur *hairpin* yang terjadi pada sekuens akan membentuk seperti lengkungan. Lengkungan yang terbentuk akan menghambat *probe* terhibridisasi secara sempurna pada target DNA (Walker dan Rapley, 2005). *Hairpin* pada sekuens terbentuk akibat pengaruh suhu yang digunakan saat proses PCR berlangsung. Suhu yang semakin meningkat akan membuat stuktur *hairpin* yang pada awalnya telah terbentuk menjadi terbuka, sehingga sekuens dapat terhibridisasi pada target DNA. Seluruh desain *probe* mutan yang dirancang telah memenuhi persyaratan *hairpin*. Selain *hairpin*, struktur sekunder yang harus diperhatikan dalam perancangan *probe* yaitu *dimer*. Pada analisis kriteria *dimer*, untuk masing-masing sekuens ditemukan terbentuknya struktur *dimer* sebanyak 3-4 basa homolog. Contoh analisis *dimer* pada salah satu sekuens dapat dilihat pada Gambar 4.



Gambar 4. Contoh Analisis *Dimer* Pada Salah Satu Sekuens

Dimer yang dihasilkan pada seluruh sekuens terpilih telah sesuai dengan jumlah *dimer* yang dipersyaratkan oleh *Clone Manager Suite 6*, yaitu tidak melebihi 5 basa homolog (Clone Manager, 2015). Analisis selanjutnya yang dilakukan yaitu analisis letak basa G di ujung 5' dan jumlah basa G-C pada sekuens. Letak basa G sebaiknya harus dijauhkan pada ujung 5', karena basa G dapat menyebabkan fluoresen yang dihasilkan *reporter* akan terhambat. *Reporter* adalah molekul donor yang dapat menghasilkan sinyal fluoresen untuk memonitoring sejumlah ampikon yang dihasilkan pada proses amplifikasi di setiap siklus PCR. Basa G diperbolehkan berada pada urutan ke-3 dari ujung 5' (Rychlik, 2010).

Untuk kriteria jumlah basa G-C, seluruh sekuens telah memenuhi persyaratan bahwa jumlah basa C lebih banyak daripada basa G. Jumlah kandungan basa C yang lebih banyak akan menyebabkan peningkatan sinyal fluoresen (Applied Biosystems, 2005). Sedangkan jika basa G lebih banyak, maka akan menyebabkan penurunan sinyal fluoresen. Hal ini berkaitan dengan sifat basa G dapat menyebabkan pemadaman sinyal fluoresen yang terbentuk (Rodríguez-Lázaro dan Hernández, 2013). Selain itu untuk mencegah pembentukan struktur sekunder pada sekuens yang diakibatkan oleh basa G (Mackay, 2007).

Dari ke-8 sekuens *TaqMan probe* mutan terpilih yang dapat digunakan untuk mendeteksi mutasi pada kodon 516, maka dilakukan pelabelan pada masing-masing sekuens. Pelabelan dilakukan menggunakan dua label fluoresen yang berperan sebagai *reporter* yaitu

FAM (6-Carboxyfluorescein) dan TAMRA (6-Carboxytetramethylrhodamine) sebagai label *quencher*. *Quencher* merupakan molekul *acceptor* yang berperan untuk mengabsorpsi sinyal fluoresen dari FAM sebelum aktivitas eksonuklease terjadi. Aktivitas eksonuklease dari DNA polimerase *TaqMan probe* merupakan aktivitas yang terjadi saat fase eksponensial, yaitu aktivitas yang memisahkan *reporter* dan *quencher* melalui proses hidrolisis *probe*, sehingga sinyal fluoresen dapat terbentuk (O'Connell, 2002; Applied Biosystems, 2004).

Pemasangan kedua label diletakkan pada basa pertama dan basa paling akhir pada masing-masing sekuens. Jarak maksimum antara kedua label yaitu 30 nukleotida (100Å) untuk menghasilkan proses deteksi mutasi yang optimal (Mackay, 2007). Jarak antara kedua label ini akan menimbulkan suatu fenomena yang disebut dengan FRET (*Fluorescence Resonance Energy Transfer*). FRET adalah fenomena saat *reporter* dan *quencher* berada pada jarak yang dekat. Sehingga *quencher* akan mudah mengabsorpsi emisi yang dihasilkan oleh *reporter*, hal ini akan menyebabkan sinyal tidak terbentuk sebelum *probe* terhibridisasi sempurna pada DNA target.

Dari hasil analisis secara *in silico*, diperoleh 8 sekuens *probe* mutan untuk mendeteksi perubahan asam aspartat menjadi valin pada kodon 516 yang telah memenuhi persyaratan *TaqMan probe*. Keberhasilan penempelan *probe* pada daerah target ditentukan oleh *primer* yang digunakan. Dalam hal ini *primer* yang digunakan telah diuji kespesifikannya secara experimental. Sehingga, penggunaan *TaqMan probe* pada metode *real-time* PCR ini dapat membantu proses deteksi mutasi lebih spesifik.

KESIMPULAN

Urutan *TaqMan probe* yang berhasil didesain secara *in silico* diperoleh sebanyak 8 sekuens, yaitu R516MV-2, R516MV-3, R516MV-4, R516MV-5, R516MV-7, R516MV-8, R516MV-11, R516MV-13. *Probe* tersebut telah memenuhi kriteria *TaqMan probe* yang ditargetkan untuk mendeteksi mutasi dengan perubahan asam aspartat menjadi valin (GAC→GTC) pada kodon 516.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada seluruh pihak yang telah banyak membantu sehingga penelitian ini dapat terselesaikan dengan baik, khususnya kepada Dr. Sagung Chandra Yowani, S.Si, M.Si, Apt. dan Bapak Putu Sanna Yustintara, S.Farm., M.Si., Apt. atas bimbingan yang telah diberikan.

DAFTAR PUSTAKA

- Applied Biosystems. 2004. Primer Express Software 3.0 Getting Started Guide. USA: Applied Biosystems.
- Applied Biosystems. 2005. Real-Time PCR Systems Chemistry Guide. USA: Applied Biosystems.
- Bio-Rad Laboratories. 2006. Real-Time PCR Applications Guide. USA: Bio-Rad Laboratories Inc.
- Borah P. 2011. Primer Designing for PCR. *Sci. Vis.* 11 (3): 134-136.
- Clone Manager. 2015. Clone Manager for Windows: Basic Edition. Version 9.5. Scientific & Educational Software.
- Dorak M.T. 2007. Real-Time PCR. New York: Taylor and Francis Group.
- Comas. 2012. Whole-Genome Sequencing Of Rifampicin-Resistant *M. tuberculosis* Strains Identifies Compensatory Mutations In RNA Polymerase. *Nat Genet.* 44(1): 106-110.
- Katzung, B.G. 2006. Basic and Clinical Pharmacology. Edisi ke-10. San Francisco: McGraw-Hill.
- Kementerian Kesehatan RI. 2015. Infodatin (Pusat Data Dan Informasi Kementerian Kesehatan RI). Jakarta: Kementerian Kesehatan Republik Indonesia.
- Mackay, I.M. 2007. Real-Time PCR In Microbiology: From Diagnosis to Characterization. UK: Caister Academic Press.
- McPherson, M.J. and S.G. Moller 2006. PCR 2nd ed. UK: Taylor & Francis Group.
- O'Connell, Joe. 2002. RT-PCR Protocols. New Jersey: Humana Press Inc.
- Pradnyaniti, D.G. 2013. Penentuan Titik Mutasi Fragmen 0,5 kb Dari Dua Isolat MDR-TB di Bali Dengan Metode Nested PCR (Skripsi). Denpasar: Universitas Udayana.
- Ram S., R. L. Singh, and R. Shanker. 2008. In silico Comparison Of Real-Time PCR Probes For Detection Of Pathogens. In *in silico Biology*. Vol. 8. Available from : <http://www.bioinfo.de/isb/2008/08/0021/main.html#img-1>.
- Ramaswamy, S., and J. M. Musser. 1998. Molecular Genetic Basis Of Antimicrobial Agent Resistance In *Mycobacterium tuberculosis*, *Tuber Lung Dis.* 79 (1): 3-29.
- Ramirez, M. V., K. C. Cowart, P. J. Campbell, G. P. Morlock, D. Sikes, J. M. Winchell, and J. E. Posey. 2010. Rapid Detection of Multidrug-Resistant *Mycobacterium tuberculosis* by Use of Real-Time PCR and High-Resolution Melt Analysis. *J Clin Microbiol.* 48 (11): 4003-4009.
- Rodríguez-Lázaro, D., and M. Hernández. 2013. Real-Time PCR in Food Science: Introduction. *Curr. Issues Mol. Biol.* 15: 25-38.
- Rychlik, Wojciech. 2010. Oligo Primer Analysis Software: Version 7. USA: Molecular Biology Insights, Inc.
- Silva, P. E. A. D., and J. C. Palomina. 2011. Molecular Basis And Mechanisms Of Drug Resistance In *Mycobacterium tuberculosis*: Classical And New Drugs. *J Antimicrob Chemother.* 66: 1417-1430.
- Siregar, T. H., J. Ellimen, and L. Owens. 2012. Development Of Real time Polymerase Chain Reaction For Detection Of *Salmonella typhimurium* And *Salmonella enteritidis* In *Fish. Squalen.* 7 (2): 51-58.
- Sun A. H., X. L. Fan., L.W. Li., L. F. Wang, W. Y. An, and J. Yan. 2009. Rapid Detection of rpoB Gene Mutations in Rif-resistant *M. tuberculosis* Isolates by Oligonucleotide Microarray. *Biomed Environ Sci.* 22: 253-258.
- Walker, J.M., and R. Rapley. 2005. Medical Biomethods Handbook. Totowa, New Jersey: Humana Press Inc.
- WHO. 2015. Global Tuberculosis Report. Edisi ke-20. Geneva, Switzerland: WHO Press.