

Optimasi Perancangan Primer Secara Bioinformatik untuk Diagnosis Infeksi Gonore Menggunakan Metode *Real-Time Polymerase Chain Reaction*

Farida Budiyananti Putri & Dina Mulyanti & Sani Ega Priani

Prodi Farmasi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Islam Bandung, Bandung, Indonesia

email: budiyantipf7@gmail.com, dina.sukma83@gmail.com, egapriani@gmail.com

ABSTRACT: Gonorrhoea is a sexually transmitted infectious disease caused by the Gram-negative bacterium *Neisseria gonorrhoeae*. The method of diagnosis that is often used is culture media, which has a drawback, including sensitivity. The Real Time-PCR method is a solution for the diagnosis of gonorrhoea infection. In Real Time-PCR, a primer in the form of a short-chain DNA sequence is needed as a specific target DNA identifier. The gene used for primary design is the opa gene. This study aims to design a method of diagnosing gonorrhoea using Real Time-PCR through an opa gene primer design approach to diagnosing gonorrhoea quickly and accurately. The primary design was carried out using the Primer Quest, Oligoanalyzer, MFEPrimer, and Snapgene Viewer sites. The nucleotide sequences of the opa gene can be searched on the NCBI site which was further analyzed using the Primer Quest, Oligoanalyzer, MFEPrimer, and Snapgene Viewer programs. Opa gene primer design results obtained 5 primer candidates with the best primer, Oligo 1 which has a forward primer base sequence of 5' GCACGGTAAGCGATTATTCAG 3' (22 mer; Tm 54,2°C; %GC 45,5; ΔG hairpin -1,97, dan ΔG self dimer -3,61 kcal/mol) and reverse yaitu 5' CCACTTTCTGTAACGGGCATA 3' (22 mer; Tm 55,1°C; %GC 45,5; ΔG hairpin 1,05 kcal/mol dan ΔG self dimer -3,61 kcal/mol) and ΔG heterodimer -4,3.

Keyword: gonorrhoea, opa gene, primary design, *Neisseria gonorrhoeae*.

ABSTRAK: Gonore merupakan suatu penyakit Infeksi Menular Seksual yang disebabkan oleh bakteri kokus Gram negatif *Neisseria gonorrhoeae*. Metode diagnosis yang sering digunakan adalah kultur media yang memiliki kekurangan antaranya adalah sensitivitas. Metode Real Time-PCR menjadi solusi untuk diagnosis infeksi gonore. Pada Real Time-PCR dibutuhkan sebuah primer berupa sekuens DNA rantai pendek sebagai pengenalan DNA target secara spesifik. Gen yang digunakan untuk perancangan primer adalah opa gen. Penelitian ini bertujuan untuk merancang metode diagnosis gonore menggunakan Real Time-PCR melalui pendekatan perancangan primer gen opa untuk mendiagnosa penyakit gonore yang cepat dan akurat. Desain primer dilakukan menggunakan situs Primer Quest, Oligoanalyzer, MFEPrimer dan Snapgene Viewer. Sekuen nukleotida dari opa gen dapat dicari dalam situs NCBI yang dianalisis lebih lanjut menggunakan program Primer Quest, Oligoanalyzer, MFEPrimer dan Snapgene Viewer. Hasil perancangan primer opa gen diperoleh 5 kandidat primer dengan primer terbaik yakni Oligo 1 yang memiliki urutan basa primer forward yaitu 5' GCACGGTAAGCGATTATTCAG 3' (22 mer; Tm 54,2°C; %GC 45,5; ΔG hairpin -1,97, dan ΔG self dimer -3,61 kcal/mol) dan reverse yaitu 5' CCACTTTCTGTAACGGGCATA 3' (22 mer; Tm 55,1°C; %GC 45,5; ΔG hairpin 1,05 kcal/mol dan ΔG self dimer -3,61 kcal/mol) serta heterodimer dengan nilai ΔG -4,3.

Kata Kunci: gonore, gen opa, desain primer, *Neisseria gonorrhoeae*.

1 PENDAHULUAN

Gonore merupakan suatu penyakit Infeksi Menular Seksual (IMS) yang disebabkan oleh bakteri kokus Gram negatif *Neisseria gonorrhoeae*. Gonore pada pria dapat menyebabkan urethritis, sedangkan pada wanita menyebabkan servicitis. Sebagian besar infeksi gonore pada wanita umumnya bersifat asimtomatik. WHO memperkirakan adanya penambahan penderita baru setiap tahunnya sekitar kurang lebih 350 juta penderita yang terjadi pada negara berkembang termasuk Indonesia, prevalensi infeksi gonore berada pada posisi teratas dari semua jenis IMS yaitu sebesar

32,4% yang lebih besar dari sifilis sebesar 21,7%. Di Indonesia, infeksi gonore ini menempati urutan tertinggi dari beberapa jenis IMS. (Nurmala and Idawati, 2018; Unemo *et al.*, 2019; Meyer and Buder, 2020).

Sejumlah teknik diagnosis telah banyak dikembangkan untuk mendeteksi infeksi gonore seperti kultur media, mikroskopi, serta metode non kultur seperti *nucleic acid amplification test (NAATs)*, *polymerase chain reaction (PCR)*, dan *ligase chain reaction (LCR)*. *Gold standard* saat ini adalah diagnosis dengan kultur pada media yang selektif, tetapi tes ini memiliki keterbatasan pada sensitivitasnya karena terjadinya reaktivitas

silang dengan mikroorganisme lain dan waktu yang dibutuhkan cukup lama untuk mendapatkan hasil diagnosanya. Pada *N. gonorrhoeae* terdapat beberapa faktor virulensi yang dapat dijadikan kandidat untuk mendeteksi ada keberadaannya. Faktor virulensi pada *N. gonorrhoeae* meliputi pili tipe IV, protein terkait opasitas (Opa), lipooligosakarida (LOS), dan porin (Por), dan protease igA (Geraats-Peters et al., 2005; Hill et al., 2016).

Real Time Polymerase Chain Reaction (Real Time-PCR) bisa menjadi alternatif dilihat dari kecepatan deteksi, spesifitas dan akurasi. Prinsip kerja dari *Real Time-PCR* akan mendeteksi sinyal fluoresensi yang sebanding dengan produk PCR yang terbentuk pada setiap siklus amplifikasinya. *Real Time-PCR* ini juga tidak membutuhkan banyak sampel pada prosesnya. Pada metode *Real Time-PCR*, primer memegang peran yang sangat penting. Perancangan primer diperlukan untuk menghasilkan primer yang spesifik digunakan pada proses amplifikasi DNA. Primer adalah nukleotida pendek berukuran 18-30 basa yang diperlukan untuk titik pelekatan enzim DNA polimerase pada proses pemanjangan DNA suatu gen spesifik secara *in vitro*. Untuk deteksi adanya infeksi gonore, terdapat beberapa gen yang dapat digunakan seperti gen *opa*. Pada penelitian sebelumnya perancangan primer gen *opa* juga dilakukan, namun jenis gen *opa* yang digunakan sebagai cetakan tidak menggunakan gen *opa G* yang dimana *opa G* ini juga terdapat pada *N. gonorrhoeae* sebanyak lebih dari 50%. Gen ini dipilih juga karena banyak ditemukan pada daerah perlekatan sel (Dennis Lo, Chiu and Chan, 2006; Ernawati, 2010; Sunarno and Novriani, 2016).

Berdasarkan latar belakang yang telah diuraikan, maka perumusan masalah dalam penelitian ini sebagai berikut: “Bagaimana merancang metode diagnosis menggunakan *Real Time-PCR* melalui pendekatan perancangan primer gen *opa* untuk mendeteksi keberadaan *N. Gonorrhoeae*?”. Penelitian ini bertujuan untuk merancang metode diagnosis gonore menggunakan *Real Time-PCR* melalui pendekatan perancangan primer gen *opa* untuk mendiagnosa penyakit gonore yang cepat dan akurat.

2 METODOLOGI

Pencarian data melalui website portal jurnal yang

dapat dengan mudah diakses *Google Search*, *Google Scholar* dan *Research Gate*. Dilakukan skrining jurnal berdasarkan waktu publikasi yaitu 10 tahun terakhir. Diekstraksi temuan penting pada jurnal dan dilakukan sintesis data.

Penelusuran Data Gen

Urutan nukleotida gen *opa* diperoleh dari database *National Center for Biotechnology Information (NCBI)*.

Pemilihan Perangkat Lunak

Perangkat lunak yang digunakan untuk desain primer, meliputi: Clustal Omega, Integrated DNA Technologies (IDT) Primer Quest Tool, Integrated DNA Technologies (IDT) Oligoanalyzer Tool, MFE Primer dan SnapGene Viewer.

Penyiapan Urutan

Penyiapan urutan sekuen parsial *opa H* (Acc no. X60711), *opa C* (Acc no. X52370), *opa G* (Acc no. X52367), *opa J* (Acc no. X52371), *opa K* (Acc no. X52364) sebagai cetakan untuk merancang beberapa pasang primer.

Penyejajaran Urutan

Penyejajaran urutan sekuen parsial gen *opaK*, *opaG*, *opaJ*, *opaH* dan *opaC* dengan Clustal Omega.

Pemilihan Kandidat Primer

Dilakukan desain primer terhadap sekuen gen *opa* dengan menggunakan software *Integrated DNA Technologies (IDT) Primer Quest Tool* dan *MFE Primer*.

Analisis Kandidat Primer

Kandidat primer yang diperoleh, kemudian dianalisis sifat-sifatnya menggunakan *Integrated DNA Technologies (IDT) Oligoanalyzer Tool* untuk mengetahui *hairpin*, *selfdimer*, dan *heterodimer*. Kandidat primer yang terpilih diuji menggunakan *Snapgene Viewer* untuk melihat posisi penempelan primer pada urutan gen *opa*.

Desain deteksi *N. gonorrhoeae* dengan metode *Real-Time PCR*

Jika primer telah siap dan dapat digunakan, maka uji coba primer dalam Real-Time PCR dapat dilakukan menggunakan metode *SYBR Green*.

3 PEMBAHASAN DAN DISKUSI

Penelusuran Data Gen Pengkode Protein Opa

Data gen pengkode protein Opa didapatkan pada salah satu jurnal penelitian yang menunjukkan bahwa protein *opa* terdapat pada beberapa spesies *Neisseria* yaitu *N. gonorrhoeae*, *N. flava*, *N.*

meningitidis, dan *N. sicca*. 45 alel unik ditetapkan pada wilayah semivariabel (SV), hipervariabel (HV 2) dan (HV 2) (Malorny et al., 1998).

Dari hasil ini diketahui bahwa terdapat beberapa persamaan dan perbedaan dari *N. gonorrhoeae* dan *N. meningitidis*. Pada spesies *N. gonorrhoeae* terdapat beberapa cluster yaitu cluster Ng-1, Ng-2, dan Ng-3. Cluster Ng-1 dan Ng-2 terdapat lebih dari 50%, sehingga dipilih beberapa sekuen parsial gen *opa* yaitu *opa H* (Acc no. X60711), *opa C* (Acc no. X52370), *opa G* (Acc no. X52367), *opa J* (Acc no. X52371), *opa K* (Acc no. X52364) yang diperoleh pada situs www.ncbi.nlm.nih.gov sebagai cetakan untuk mendesain primer yang spesifik.

Pada penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh (Geraats-Peters et al., 2005) perancangan primer gen *opa* juga dilakukan, namun jenis gen *opa* yang digunakan sebagai cetakan tidak menggunakan gen *opa G*. Pada penelitian ini *opa G* dipilih juga dikarenakan setelah dilakukannya penelusuran pustaka lain *opa G* juga terdapat pada *N. gonorrhoeae* lebih dari 50%.

Penyejajaran Urutan

Sekuen yang digunakan adalah urutan nukleotida gen *opa* dari *N. gonorrhoeae* yaitu *opa H* (Acc no. X60711), *opa C* (Acc no. X52370), *opa G* (Acc no. X52367), *opa J* (Acc no. X52371), *opa K* (Acc no. X52364) dikarenakan pada *N. gonorrhoeae* 5 gen ini terdapat lebih dari 50% sehingga dapat dirancang primer yang mampu mendeteksi keberadaan *N. gonorrhoeae* baik pada manusia maupun organisme lain. Kelima gen *opa* tersebut memiliki sedikit perbedaan pada urutan nukleotidanya sehingga perlu dilakukan penyejajaran menggunakan *Clustal Omega* untuk menemukan kemiripan yang akan digunakan untuk perancangan kandidat primer. Untuk merancang kandidat primer digunakan sekuen dari hasil penyejajaran yang diketahui bahwa seluruh gen *opa* memiliki homologi tinggi dengan *opa k* pada daerah nukleotida 649-825, sehingga *opa k* dipilih sebagai cetakan untuk perancangan primer. Kemiripan urutan yang tinggi menjadi dasar pembuatan primer seperti yang dapat dilihat pada **Gambar 2**.

Gambar 1. Hasil penyejajaran 5 gen pengkode protein Opa yang memiliki kemiripan urutan yang tinggi.

Perancangan Kandidat Primer

Percangan primer dilakukan untuk mendapatkan primer yang dapat digunakan pada proses amplifikasi DNA dengan metode PCR. Keberhasilan amplifikasi DNA tergantung dari spesifisitas primer yang digunakan. Perancangan kandidat primer dilakukan menggunakan *Integrated DNA Technologies* '(IDT) *Primer Quest Tool*. Perancangan kandidat primer dilakukan pada situs <https://www.idtdna.com/> dengan memilih menu *Tools* dan memilih *Primer Quest Tool*.

Urutan pasangan primer dari *Primer Quest* dan besar produk PCR (amplikon) dapat dilihat pada **Tabel 1**.

Tabel 1. Hasil Pencarian Kandidat Primer Menggunakan *Primerquest Tool*.

Nama Primer	Primer Forward (5'→ 3')	Primer Reverse (5'→ 3')	Panjang Produk
Primer 1	GCACGGTAAGCGATTATTTTCAG	GCATAATCTGCCGCTATCT	103
Primer 2	AACATCCGTACGCATTCATC	CCACTTCTGTAACGGGCATAA	96
Primer 3	TGGAGGATAGCGGAGATTAT	GCCCTGTGTTCTTAGCAACTCT	90
Primer 4	GCGATTATTCAGAAACATCCGTA	TTGTGTTCCACTTCTGTAACG	118
Primer 5	TCGGTCCGCTACGACTT	GCTCACGGAATATTTATGTTGTTC	87

Kemudian dilakukan pengecekan ulang kandidat primer menggunakan *MFEprimer* untuk melihat apakah kandidat pasangan primer dapat menempel pada spesies target yaitu *N. gonorrhoeae*. Hasil karakterisasi pasangan primer dari *Primer Quest* pada *MFEprimer* memberikan pasangan kandidat primer baru yang dapat dilihat pada **Tabel 2**.

Tabel 2. Hasil analisis kandidat primer menggunakan *MFEprimer*

Nama Primer	Primer Forward (5'→3')	Primer Reverse (5'→3')	Panjang Produk
Oligo 1	GCACGGTAAGCGATTATTCAG	CCACTTCTGTAAACGGGCATAA	119 bp
Oligo 2	GCGATTATTCAGAAACATCCGTA	CCACTTCTGTAAACGGGCATAA	110 bp
Oligo 3	GCACGGTAAGCGATTATTCAG	TTGTTGTTCCACTTCTGTAAACG	127 bp
Oligo 4	TGGAGGATAGCGGCAGATTAT	TTGTTGTTCCACTTCTGTAAACG	47 bp
Oligo 5	GCGATTATTCAGAAACATCCGTA	GCATAATCTGCCGCTATCCT	94 bp

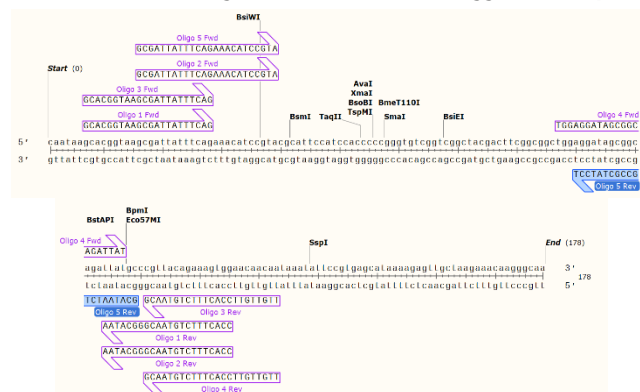
Hasil yang didapatkan dari *MFEprimer* berbeda dengan *Primer Quest Tools* dikarenakan *Primer Quest Tools* hanya dapat menghasilkan pasangan kandidat primer tanpa analisis penempelannya. Maka dari itu, primer yang dipilih adalah yang diperoleh dari *MFEprimer* karena dapat dibuktikan penempelannya pada gen target *N. gonorrhoeae*. Berdasarkan hasil analisis menggunakan *MFEprimer*, dengan melihat panjang produk, yang memenuhi persyaratan adalah Oligo 1, 2, 3 dan 5 karena berada pada rentang 80-200 bp. Pasangan Oligo 4 tidak dipilih karena tidak memenuhi persyaratan.

Panjang ampikon pada penggunaan *Real Time-PCR* yang baik adalah sekitar 80-200 bp sehingga proses *extension* akan lebih cepat. Proses ini harus cepat dikarenakan *Real Time-PCR* ini merupakan alat yang memiliki keunggulan dari kecepatan deteksinya yang hasilnya diperkirakan akan keluar sekitar 2-3 jam (Mawarnursavira, Sari and Apridamayanti, 2016).

Analisis Kandidat Primer

Kandidat pasangan primer yang diperoleh dari *MFEprimer* selanjutnya dianalisis menggunakan *Snapgene Viewer* dan *IDT Oligoanalyzer 3.1*. *Snapgene Viewer* dapat digunakan untuk visualisasi penempelan primer pada cetakan DNA target.

Dapat dilihat dari Gambar 3 semua kandidat pasangan primer menempel pada daerah yang *conserved*. Semua kandidat primer penting untuk menempel pada daerah yang *conserved* sehingga nantinya primer dapat mengenali 5 gen pengkode protein Opa dan dapat memperoleh hasil yang spesifik untuk deteksi infeksi gonore.



Gambar 2. Hasil penempelan kandidat primer forward dan reverse menggunakan *Snapgene Viewer*.

Analisis primer dilanjutkan menggunakan *Oligoanalyzer* dengan masuk ke menu tools dan memilih *Oligoanalyzer*. Analisis kandidat primer menggunakan *Oligoanalyzer* menghasilkan beberapa parameter, diantaranya adalah panjang basa, *melting temperature* (Tm), % GC, *hairpin*, *selfdimer* dan *heterodimer*.

Tabel 3. Hasil analisis panjang basa, Tm, dan %GC.

Nama Primer	Kandidat Primer	Panjang basa	TM (°C)	%GC (%)
Oligo 1	Forward	22	54.2	45.5
	Reverse	22	55.1	45.5
Oligo 2	Forward	24	53.4	37.5*)
	Reverse	22	55.1	45.5
Oligo 3	Forward	22	54.2	45.5
	Reverse	23	53.7	39.1*)
Oligo 4	Forward	21	55.5	47.6
	Reverse	23	53.7	39.1*)
Oligo 5	Forward	24	53.4	37.5*)
	Reverse	20	54.7	50

Keterangan: *) Tidak memenuhi syarat.

Tabel 4. Hasil analisis *hairpin*, *selfdimer*, dan *heterodimer*.

Nama Primer	Kandidat Primer	Hairpin (kcal/mol)	Selfdimer (kcal/mol)	Heterodimer (kcal/mol)
Oligo 1	Forward	-1.97	-3.61	-4.38
	Reverse	1.05	-3.61	
Oligo 2	Forward	0.98	-5.46	-9.02*)
	Reverse	1.05	-3.61	
Oligo 3	Forward	-1.97	-3.61	-3.61
	Reverse	1.18	-3.61	
Oligo 4	Forward	2.42	-3.61	-6.6*)
	Reverse	1.18	-3.61	
Oligo 5	Forward	0.98	-5.46	-7.43*)
	Reverse	-1.06	-5.09	

Keterangan: *) Tidak memenuhi syarat.

Hasil analisis panjang basa, *melting temperature* (T_m), % GC, *hairpin*, *selfdimer* dan *heterodimer* dapat dilihat pada **Tabel 3 dan Tabel 4**. Hasil analisis panjang basa pada semua kandidat primer masuk kedalam rentang, yaitu 18-30 nukleotida.

Hasil analisis T_m dari seluruh kandidat primer menunjukkan hasil memenuhi syarat, yaitu 52° - 58°C .

%GC adalah persentase jumlah basa guanin dan juga sitosin yang terdapat pada suatu primer. Syarat %GC adalah 40-60% (Syaputra, Sari and Apridamayanti, 2018). Oligo 1 *forward* dan *reverse*, primer *reverse* Oligo 2, primer *forward* Oligo 3, primer *forward* Oligo 4, dan primer *reverse* Oligo 5. Primer *forward* Oligo 2, primer *reverse* Oligo 3, primer *reverse* Oligo 4, dan primer *forward* Oligo 5 tidak memenuhi syarat karena berada dibawah rentang 40-60%. Primer dengan nilai %GC rendah dapat menurunkan efisiensi proses PCR karena primer menjadi tidak mampu menempel secara efektif pada cetakan, sedangkan primer yang memiliki nilai %GC tinggi dapat menyebabkan terbentuknya ikatan yang terlalu kuat antara primer dengan DNA target dapat menyebabkan rendahnya hasil PCR (Pratiwi, Sari and Apridamayanti, 2017).

Hairpin adalah salah satu struktur sekunder dari primer yang sebaiknya dihindari pada saat mendesain primer. Stabilitas struktur *hairpin* ditentukan oleh adanya energi bebas. Nilai Energi bebas yang masih dapat ditoleransi adalah ΔG yang lebih besar dari -3 kcal/mol. Energi bebas yang semakin negatif akan menyebabkan terjadinya reaksi pembentukan *hairpin* yang semakin stabil (Rudiretna and Handoyo, 2001).

Berdasarkan hasil analisis pada **Tabel 4**, semua kandidat pasangan primer memenuhi syarat karena memiliki nilai ΔG pada *hairpin* yang lebih kecil dari seharusnya yaitu -3 kcal/mol. Sehingga reaksi pembentukan *hairpin* akan semakin tidak stabil.

Self dimer adalah ikatan pada dua primer yang sejenis yaitu primer *forward* dengan primer *forward* atau juga pada primer *reverse* dengan primer *reverse*. Stabilitas struktur *self dimer* ditentukan oleh adanya energi bebas. Nilai energi bebas yang masih dapat ditoleransi adalah ΔG yang lebih besar dari -6 kcal/mol. Energi bebas yang semakin negatif akan menyebabkan terjadinya reaksi pembentukan *selfdimer* yang semakin stabil (Rudiretna and Handoyo, 2001)

Berdasarkan hasil analisis *selfdimer* **Tabel 4**, semua kandidat pasangan primer memenuhi syarat karena memiliki nilai ΔG pada *selfdimer* yang lebih positif dari seharusnya yaitu -6 kcal/mol sehingga struktur sekunder *selfdimer* akan semakin tidak stabil dan tidak mengganggu proses penempelan primer (*annealing*).

Heterodimer adalah ikatan yang terjadi pada suatu primer berikatan dengan primer pasangannya yaitu primer *reverse* dan juga primer *forward*. Stabilitas struktur *self dimer* ditentukan oleh adanya energi bebas. Nilai energi bebas yang masih dapat ditoleransi adalah ΔG yang lebih besar dari -6 kcal/mol. Energi bebas yang semakin negatif akan menyebabkan terjadinya reaksi pembentukan *heterodimer* yang semakin stabil (Rudiretna and Handoyo, 2001).

Berdasarkan hasil analisis yang seperti ditampilkan pada **Tabel 4**. Kandidat pasangan primer yang memenuhi syarat adalah Oligo 1 dan 3 hal ini dikarenakan nilai ΔG pada *heterodimer* yang didapatkan lebih positif dari -6 kcal/mol. Pada kandidat pasangan primer Oligo 2, Oligo 4 dan Oligo 5 nilai ΔG pada *heterodimer* yang didapatkan lebih negatif dari -6 kcal/mol sehingga kandidat pasangan primer tidak memenuhi syarat dikarenakan dapat terbentuknya struktur sekunder *heterodimer* yang lebih stabil.

Berdasarkan analisis primer yang telah dilakukan pasangan primer Oligo 1 memenuhi seluruh persyaratan dengan nilai T_m primer *forward* $54,2^\circ\text{C}$; %GC 45,5; ΔG *hairpin* -1,97 kcal/mol; dan ΔG *self dimer* -3,61 kcal/mol dan primer *reverse* dengan nilai T_m $55,1^\circ\text{C}$; %GC 45,5; ΔG *hairpin* 1,05 kcal/mol, dan ΔG *self dimer*

-3,61 kcal/mol) serta kedua primer berpotensi menghasilkan *heterodimer* dengan nilai ΔG -4,38 kcal/mol.



Gambar 3 Hasil analisis penempelan primer terhadap a) gen *opa K*; b) *opa J*; c) *opa H*; d) *opa G* dan e) *opa C*. 1. Primer *forward* dan 2. Primer *reverse* (SnapgeneViewer).

Kemudian Oligo 1 sebagai kandidat pasangan primer terbaik ini dilakukan pengecekan penempelan terhadap 5 gen *opa* menggunakan SnapGene Viewer. Dikarenakan pengambilan urutan pada saat merancang kandidat primer ini menggunakan salah satu gen yaitu *opa K* dari 5 gen maka dilakukan pengecekan terhadap 5 gen yaitu gen *opa K*, *opa J*, *opa H*, *opa G* dan *opa C*. Seperti yang telah di ditampilkan pada **Gambar 3 dan 4**.

Desain Metode Real Time-PCR

Berdasarkan hasil penelusuran dari situs resmi lab klinis Prodia yang diakses melalui <https://prodia.co.id/id>, diagnosis infeksi gonore yang telah berjalan adalah dengan pewarnaan gram baik infeksi yang terjadi pada wanita maupun pria. Hal ini sejalan dengan yang

diinformasikan oleh WHO terkait deteksi infeksi gonore yaitu menggunakan pewarnaan gram dan juga metode kultur. Namun demikian, pemeriksaan molekuler juga sedang dikembangkan seperti *Nucleic Acid Amplification Test* (NAAT) (Wijanarko, 2019).

Primer terbaik yang telah didapatkan berdasarkan hasil analisis diatas dapat diaplikasikan mendiagnosis infeksi gonore menggunakan metode *Real Time-PCR*. Pada metode *Real Time-PCR* akan dihasilkan produk berupa amplicon yang diperoleh melalui tiga tahap terdiri dari denaturasi, annealing (penempelan primer) dan ekstension (pemanjangan urutan nukleotida). Denaturasi bertujuan untuk memutus ikatan hidrogen yang mengikat satu sisi heliks ke sisi lainnya sehingga memungkinkan dua untai terpisah. *Annealing* (peleburan/penempelan) merupakan tahap terjadinya penempelan primer pada cetakan DNA. *Extension* (pemanjangan) adalah proses pemanjangan untai DNA baru (Tooy, Bernadus and Sorisi, 2016).

Beberapa komponen yang digunakan untuk proses *Real Time-PCR* adalah cetakan DNA, primer, *buffer*, $MgCl_2$ dan enzim DNA polymerase. Cetakan DNA adalah DNA target yang berasal dari specimen klinis seperti berupa urin, usap serviks, dan usap uretra. dNTPs berfungsi sebagai sebagai *building block* DNA yang diperlukan dalam proses ekstensi DNA. Primer yang merupakan salah satu komponen yang dapat menentukan keberhasilan proses *Real Time-PCR* yang berfungsi sebagai pembatas fragmen DNA target yang akan diampifikasi dan berfungsi juga dalam menyediakan gugus hidroksi (-OH) pada ujung 3' yang diperlukan pada proses ekstensi DNA. *Buffer* ditambahkan untuk menjamin kondisi pH pada mediumnya. $MgCl_2$ berfungsi untuk menstimulasi aktivitas DNA polimerase. Komponen lainnya yang diperlukan adalah enzim DNA polimerase yang berfungsi untuk tahap ekstensi DNA (Rudiretna and Handoyo, 2001).

Real-Time PCR memiliki perbedaan dengan PCR konvensional *Real-Time PCR*. Pada PCR konvensional, hasil amplifikasi DNA diamati pada akhir reaksi menggunakan elektroforesis gel agarose, sedangkan untuk analisa menggunakan *Real-Time PCR* dapat dilakukan pada saat reaksi sedang berlangsung. Interpretasi hasil dari *Real-Time PCR* adalah berdasarkan pada nilai Ct yang

diperoleh. Nilai Ct ditentukan terutama oleh jumlah cetakan pada awal reaksi amplifikasi. Apabila nilai Ct muncul pada instrument *Real-Time PCR* maka dipastikan gen dari *N. gonorrhoeae* terdeteksi dan menunjukkan adanya bakteri *N. gonorrhoeae* (Ferlianti, Supali and Wibowo, 2012).

Desain amplifikasi DNA menggunakan metode *SYBR Green*. Pemilihan *SYBR Green* dikarenakan *SYBR Green* lebih ekonomis dan juga mudah dalam penanganan. *SYBR Green* ini tidak memerlukan probe yang membutuhkan biaya tambahan untuk mensintesisnya. Metode *SYBR Green* dilakukan dengan cara *SYBR Green Mastermix* dibuat dengan komposisi DNA yang diuji; air bebas nuklease; primer *forward* 5' GCA CGG TAA GCG ATT ATT TCA G 3'; primer *reverse* 5' CCA CTT TCT GTA ACG GGC ATA 3'; dan *LightCycler® 480 SYBR Green*. DNA yang akan diuji dan *SYBR Green Mastermix* dimasukkan ke dalam *multiwell plate*. Campuran selanjutnya, *Real-Time PCR* dinyalakan, dilakukan pengaturan program, dan alat dijalankan (Zilhadia, Izzah and Betha, 2017).

4 KESIMPULAN

Berdasarkan hasil analisis dan pembahasan data, penulis memperoleh kesimpulan bahwa hasil perancangan primer yang dapat digunakan pada identifikasi *N. gonorrhoeae* untuk diagnosis gonore menggunakan *Real Time-PCR* menghasilkan satu kandidat terbaik pasangan primer Oligo 1 dengan urutan nukleotida primer *forward* 5' GCA CGG TAA GCG ATT ATT TCA G 3' (22 mer; Tm 54,2 ; %GC 45,5; ΔG *hairpin* -1,97 kcal/mol; dan ΔG *self dimer* -3,61 kcal/mol) dan *reverse* 5' CCA CTT TCT GTA ACG GGC ATA 3' (22 mer; Tm 55,1; %GC 45,5; ΔG *hairpin* 1,05 kcal/mol, dan ΔG *self dimer* -3,61 kcal/mol) serta kedua primer berpotensi menghasilkan *heterodimer* dengan nilai ΔG -4,38 kcal/mol.

ACKNOWLEDGE

Terimakasih kepada Ibu Dr. apt. Dina Mulyanti, M.Si. dan Ibu apt. Sani Ega Priani, M.Si. selaku dosen pembimbing yang telah memberikan bimbingan kepada penulis selama penulisan artikel ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Dennis Lo, Y. M., Chiu, R. W. K. and Chan, K. C. A. (2006) *Clinical Application of PCR*, Humana Press Inc. 999 Riverview Drive, Suite 208 Totowa, New Jersey 07512.
- Ernawati (2010) 'Gonorrhea Urethritis', *Jurnal ilmiah Kedokteran*, Edisi Khusus, pp. 40–46.
- Ferlianti, R., Supali, T. and Wibowo, H. (2012) 'Optimalisasi Real Time PCR untuk Diagnosis Filariasis Bancrofti pada Sediaan Hapus Darah Tebal Optimization of Real Time PCR for the Diagnosis of Bancroftian Filariasis on Thick Blood Film Preparation', *Jurnal Kedokteran Yarsi*, 20(1), pp. 014–022.
- Geraats-Peters, C. W. M. et al. (2005) 'Specific and sensitive detection of Neisseria gonorrhoeae in clinical specimens by real-time PCR', *Journal of Clinical Microbiology*, 43(11), pp. 5653–5659.
- Hill, S. A., Masters, T. L. and Wachter, J. (2016) 'Gonorrhea – An evolving disease of the new millennium', *Microbial Cell*, 3(9), pp. 371–389.
- Malorny, B. et al. (1998) 'Sequence diversity, predicted two-dimensional protein structure, and epitope mapping of neisserial Opa proteins', *Journal of Bacteriology*, 180(5), pp. 1323–1330.
- Mawarnursavira, K., Sari, R. and Apridamayanti, P. (2016) 'Optimasi Melting Temperature Primer Degenerate Pada Suhu 60°C Gen Erm(T) (Erythromycin Ribosome Methylase) Yang Resistensi Terhadap Bakteri Streptococcus pyogenes'.
- Meyer, T. and Buder, S. (2020) 'The laboratory diagnosis of neisseria gonorrhoeae: Current testing and future demands', *Pathogens*, 9(2), pp. 1–19.
- Nurmala, N. and Idawati, I. (2018) 'Pengetahuan dan Sikap Tentang Penyakit Infeksi Menular Seksual (IMS) pada Ibu Rumah Tangga di Puskesmas Tulang Bawang Barat', *Jurnal Ilmiah Keperawatan Sai Betik*, 13(2), p. 186.
- Pratiwi, A., Sari, R. and Apridamayanti, P. (2017) 'Optimasi Suhu Desain Primer Gen Blaz Resistensi Pada Bakteri Staphylococcus Aureus Secara In Silico', (1), pp. 3–12.
- Rudiretna, A. and Handoyo, D. (2001) 'Prinsip

Umum Dan Pelaksanaan Polymerase Chain Reaction (PCR)', 9(1), pp. 17–29.

- Sunarno and Novriani, H. (2016) 'Desain Primer PCR Secara Manual untuk Amplifikasi Gen dtx Bakteri Penyebab Difteri dengan Masalah Homologi Sekuens DNA', *The Biomedical and Basic Health Tecnology, Health Research and Development Centre, Jakarta*, 66(12), p. 2.
- Syaputra, D., Sari, R. and Apridamayanti, P. (2018) 'Desain Primer Spesifik Gen Tetb (Tetracycline Resistance Protein) Bakteri *Bacillus subtilis*', pp. 1–11.
- Tooy, D. C., Bernadus, J. B. and Sorisi, A. (2016) 'Deteksi *Plasmodium falciparum* dengan menggunakan metode real-time polymerase chain reaction di daerah Likupang dan Bitung', *Jurnal e-Biomedik*, 4(1).
- Unemo, M. *et al.* (2019) 'Gonorrhoea', *Nature Reviews Disease Primers*, 5(1).
- Wijanarko, M. S. P. (2019) 'Infeksi, Rekomendasi Terapi, dan Resistensi Gonore', *Cermin Dunia Kedokteran*, 46(8), pp. 511–515.
- Zilhadia, Z., Izzah, A. N. and Betha, O. S. (2017) 'Perbandingan Metode SYBR Green dan Hydrolysis Probe dalam Analisis DNA Gelatin Sapi dan Gelatin Babi Menggunakan Real Time Polymerase Chain Reaction', *Jurnal Sains Farmasi & Klinis*, 4(1), p. 16.
- R Fathan Said, Darma Gita Cahya Eka, Kodir Reza Abdul. (2021). *Formulasi sediaan Cuka Buah Kopi Menggunakan Ragi (*Saccharomyces cerevisiae*) dan Bakteri (*Acetobacter aceti*)*. *urnal Riset Farmasi*, 1(1), 38-45.