

Primer Design and in Silico PCR for Detection *Shigella Sp.* on Refilled Water Samples

Desain Primer dan PCR *In Silico* untuk Deteksi *Shigella Sp.* pada Sampel Air Minum Isi Ulang

Deratih Bunga Purwakasih, Afifatul Achyar*

Department of Biology, Faculty of Mathematics and Natural Sciences, Universitas Negeri Padang, West Sumatera, Indonesia

*Corresponding author: afifatul.achyar@fmipa.unp.ac.id

Abstract. Refillable drinking water is an effort to meet the needs of drinking water for consumption by modern society. One of the quality parameters of drinking water suitable for consumption is not contaminated with *Escherichia coli*, *Salmonella* sp. and *Shigella* sp. Conventional microbiological tests were often conducted for the detection of water pathogenic bacteria, including culturing the bacteria in medium culture and biochemical assay, but this method requires a long working time and expensive costs. Currently, Polymerase Chain Reactions (PCR) can be an alternative method because it has high accuracy. Primers are one of the important components of PCR so they must be specifically designed to ensure the success of DNA amplification. This study aimed to obtain the specific sequence of PCR primer for detection *Shigella*-contaminated refillable drinking water sample and conducted the *in silico* PCR. Primers were designed *in silico* using Primer BLAST in NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) and Geneious Prime for *in silico* PCR. To get a *Shigella*-specific primer, *pairwise alignment* of *Shigella* sp. (NC_004337.2) and *E. coli* (NC_000913.3) was performed and specific sequence of *Shigella* was used as primer candidates. The result of this study were the *Shigella*-specific sequence PCR primer forward 5'-GCTAATGAAAATGGCGCTGT-3' and reverse 5'-AGCCGACGGTTTGAAGTTAC-3' with PCR *product length* of 815 bp.

Key words: Refillable drinking water, *Shigella* sp., Primer Design, *in silico* PCR.

Abstrak. Air minum isi ulang merupakan upaya pemenuhan kebutuhan air minum untuk konsumsi masyarakat modern. Salah satu parameter kualitas air minum yang layak dikonsumsi adalah tidak tercemar *Escherichia coli*, *Salmonella* sp. dan *Shigella* sp. Uji mikrobiologi konvensional umum dilakukan untuk mendeteksi bakteri patogen air, melalui kultur bakteri dan uji biokimia, tetapi metode ini membutuhkan waktu pengerjaan yang lama dan biaya yang mahal. Saat ini *Polymerase Chain Reactions* (PCR) dapat menjadi metode alternatif karena prosesnya yang singkat dan memiliki akurasi yang tinggi. Primer adalah salah satu komponen penting PCR sehingga harus dirancang khusus untuk memastikan keberhasilan amplifikasi DNA. Penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan urutan spesifik primer PCR untuk deteksi sampel air minum isi ulang yang tercemar *Shigella* dan dilakukan PCR secara *in silico*.

Primer dirancang menggunakan Primer BLAST pada NCBI (National Center for Biotechnology Information) dan PCR *in silico* menggunakan Geneious Prime. Untuk mendapatkan primer spesifik *Shigella*, *pairwise alignment* *Shigella* sp. (NC_004337.2) dan *E.coli* (NC_000913.3) dilakukan dan region yang spesifik *Shigella* digunakan sebagai kandidat primer. Hasil dari penelitian ini adalah primer PCR sekuens spesifik *Shigella forward* 5'-GCTAATGAAAATGGCGCTGT-3' dan *reverse* 5'-AGCCGACGGTTTGAAGTTAC-3' dengan panjang produk PCR 815 bp.

Kata kunci: Air Minum isi Ulang, *Shigella* sp., Desain Primer, PCR *in silico*.



This is an open access article distributed under the Creative Commons 4.0 Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited. ©2020 by author.

Pendahuluan

Air minum isi ulang merupakan suatu upaya pemenuhan kebutuhan air minum untuk dikonsumsi masyarakat moderen. Air minum isi ulang biasanya diperoleh dari depot air minum isi ulang yang menjadi alternatif sebab harganya jauh lebih murah dibanding produk air minum dalam kemasan bermerek. Hal itulah yang menyebabkan depot air minum di berbagai kota di Indonesia tumbuh dengan sangat pesat (Bambang dkk., 2014). Air minum dengan kualitas yang tidak memenuhi standar akan berdampak buruk bagi kesehatan karena keberadaan bakteri patogen yang menjadikan air minum sebagai media penyebaran. Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Nuria, Rosyid & Sumantri (2009) berpatokan pada Surat Keputusan Menteri Kesehatan No.907/Menkes/SK/VII/2002 menyatakan bahwa salah satu parameter kualitas air minum layak konsumsi adalah tidak tercemar bakteri *Escherichia coli*, *Salmonella* sp. dan *Shigella* sp.

Shigella sp. termasuk bakteri Gram negatif yang berbentuk batang, tidak berspora, tidak berkapsul, dan tidak motil, berukuran 0,5-3 µm, tumbuh optimum pada suhu 37°C dan pH 7,4 (Parija, 2012; Sari, 2012). *Shigella* sp. dapat tersebar melalui fekal-oral secara langsung ataupun melalui makanan dan minuman yang terkontaminasi (Atmiati, 2012). *Shigella* melakukan multiplikasi tanpa invasi di dalam jejunum lalu memproduksi toksin yang disebut dengan Shigatoksin. Toksin akan berikatan dengan reseptor dan menyebabkan aktivasi proses sekresi air sehingga terjadi *watery diarrhea* (Venkatesan dkk., 2012), kondisi inilah yang dinamakan Shigellosis, dimana penderitanya mengalami diare. Gejala klinis shigellosis dimulai dari diare ringan sampai disentri berat, tergantung pada serotype *Shigella* sp. yang menyebabkan infeksi dan imunitas inangnya. Survei yang dilakukan oleh Herwana dkk. (2010) pada 612 anak umur 0-12 tahun yang menderita diare menunjukkan hasil 9,3% disebabkan oleh *Shigella* sp. dan 63,2% (36/57) diantaranya merupakan *S. flexneri*.

Uji mikrobiologis sering dilakukan untuk deteksi bakteri patogen air adalah secara konvensional, yaitu cara kultur dan sifat biokimia. Namun, metode ini memerlukan waktu pengerjaan yang lama dan biaya mahal, karena harus dilakukan uji lanjutan yaitu uji biokimia, serologis dan verotoksitas. Selain itu, hasil yang didapat juga tidak spesifik. Oleh karena itu, pengembangan metode untuk deteksi patogen air ini perlu dilakukan. Saat ini, metode *Polymerase Chain Reactions* (PCR) dapat menjadi alternatif karena memiliki keakuratan yang tinggi (Radji dkk., 2010).

Metode PCR merupakan metode revolusioner yang dikembangkan oleh Kary Mullis pada tahun 1980-an. Prinsip kerja PCR didasarkan pada kemampuan enzim DNA polimerase untuk mensintesis untai DNA baru yang merupakan komplementer dari DNA cetakan (Mullis dkk., 1994). Komponen utama reaksi PCR terdiri dari: *template* DNA atau DNA cetakan; primer yang didesain; enzim DNA polimerase; dan nukleotida (dNTP atau deoxynucleoside triphosphate) (Handoyo & Ari, 2001).

Primer merupakan potongan pendek DNA untai tunggal yang komplemen dengan urutan gen target. Primer harus didesain spesifik untuk menjamin keberhasilan proses amplifikasi DNA pada metode PCR (Diss, 2003). Perancangan untuk memperoleh suatu primer yang memenuhi kriteria untuk amplifikasi dapat dilakukan secara *in silico*, yaitu merancang atau mendesain primer dengan bantuan suatu program dalam komputer (*software*). Salah satu *software* yang umum digunakan untuk studi literatur dan BLASTING Primer adalah sebuah fitur BLAST dalam NCBI (*National Center for Biotechnology Information*). BLAST berfungsi

untuk menganalisis spesifisitas dari primer yang telah dirancang, menggunakan data GeneBank DNA database (Munsinin dkk., 2018).

Penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan sekuen primer PCR yang spesifik dalam pemeriksaan sampel air minum isi ulang yang tercemar *Shigella* dan mensimulasikannya dengan PCR *in silico*. Primer PCR tersebut diharapkan dapat digunakan untuk deteksi secara molekuler keberadaan bakteri *Shigella* sp. pada sampel air minum isi ulang. Hal ini perlu dilakukan untuk keakurasian hasil dan menghemat alokasi waktu pengerjaan.

Bahan dan Metode

Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah sekuen genom lengkap *Shigella* sp. (NC_004337.2) dan *E.coli* (NC_000913.3) yang diunduh dari GenBank NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Alat yang digunakan adalah software bioinformatik Geneious Prime berbasis primer3 untuk mendesain primer dan [PCR secara *in silico*](#).

Metode

Sekuen gen *Shigella* sp. dan *Escherichia coli* sangat mirip sehingga akan sulit mencari gen yang spesifik untuk masing – masing spesies. Oleh karena itu, strategi dalam mendesain primer spesifik *Shigella* dilakukan dengan cara melakukan *pairwise alignment* sekuen genom lengkap *Shigella* sp. dan *E.coli* menggunakan BLAST NCBI. Region yang spesifik spesies dijadikan kandidat primer.

Primer yang didesain harus memenuhi kriteria primer ideal yakni memiliki panjang nukleotida berkisar 18-30 bp, memiliki komposisi basa G dan C 40-60%, Tm antara primer forward dan reverse tidak memiliki selisih lebih dari 5°C, dan tidak membentuk struktur sekunder (hairpin atau self dimer). Kandidat primer yang telah diperoleh dari hasil *pairwise alignment* dicek menggunakan software Geneious Prime untuk memastikan telah memenuhi kriteria primer ideal di atas.

Spesifisitas primer yang telah didesain diperiksa menggunakan Primer BLAST *tools* di situs NCBI. Tujuan pengecekan ini adalah untuk memastikan primer yang telah didesain hanya akan mengamplifikasi gen target spesifik *Shigella* sp. Pasangan primer yang diperoleh disimulasikan dengan PCR *in silico* menggunakan Geneious Prime.

Hasil dan Pembahasan

Pada penelitian ini dilakukan desain primer secara *in silico* menggunakan Primer BLAST pada NCBI. *Sequence alignment* merupakan proses penjajaran dua atau lebih sekuen sehingga perbedaan dan persamaan akan terlihat nyata (Xiong, 2006). Sekuen *Shigella* sp. dan *E.coli* memiliki *similarity* (kesamaan) 99%, artinya susunan nukleotida yang sangat mirip. Untuk mendapat primer yang spesifik *Shigella* dilakukan *Pairwise Alignment* dari *Shigella* sp. (NC_004337.2) dan *E.coli* (NC_000913.3). Gambar 1 dan 2 menunjukkan penggalan hasil penjajaran genom lengkap kedua bakteri pada daerah yang spesifik. Pairwise alignment ini menghasilkan primer *forward* 5'-GCTAATGAAAATGGCGCTGT-3' dan primer *reverse* 5'-AGCCGACGGTTTGAAGTTAC-3'. Kedua primer ini merupakan primer terbaik diantara kandidat primer.

```

Query 3295460 ATGCTCGACGCCCTTCCGCGCTAATGAAAATGGCGCTGTGCCACTGCCGTTGACGGCAAAC 3295519
Sbjct 3303254 .....C.....CA.....G... 3303313
    
```

Gambar 1. Kandidat Primer Forward Hasil *Pairwise Alignment* *Shigella* sp. NC_004337.2 (Query) dan *E.coli* NC_000913.3 (Sbjct)

```

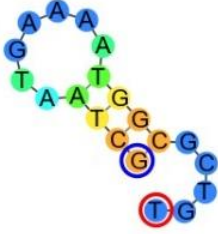
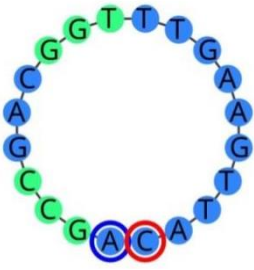
Query 3296240 ATATGTTGTTCCAGGCGCTGCATCTTTATCGCAGTAACCTCAAACCGTCGGCTCGGCTGG 3296299
Sbjct 3304034 .....C.....C.....A..A..... 3304093
    
```

Gambar 2. Kandidat Primer Reverse Hasil *Pairwise Alignment* *Shigella* sp. NC_004337.2 (Query) dan *E.coli* NC_000913.3 (Sbjct)

PCR *in silico* dilakukan untuk mensimulasikan dan memprediksi hasil PCR serta meminimalisir kesalahan saat PCR yang dilakukan secara *in vitro*. PCR yang dilakukan secara *in silico* ini menggunakan

perangkat lunak (*Software*) Geneious Primer. Geneious Prime merupakan aplikasi bioinformatika *user-friendly* yang mengintegrasikan analisis data genomik. *Software* ini juga dapat digunakan untuk memastikan kandidat primer telah memenuhi kriteria ideal untuk amplifikasi (Kearse dkk., 2012).

Tabel 1. Karakteristik Primer Hasil Desain

No.	Karakteristik Primer	DNA Fold	Ukuran Amplikon
1.	<p>SHIGELLA F</p> <p>Sequence (5' to 3'): GCTAATGAAAATGGCGCTGT</p> <p>Type: Primer Length: 20 %GC: 45.0 Hairpin Tm: None Self Dimer Tm: 7.6 Tm: 57.4 created by: primer3</p>		815 bp
2.	<p>SHIGELLA R</p> <p>Sequence (5' to 3'): AGCCGACGGTTTGAAGTTAC</p> <p>Type: Primer Length: 20 %GC: 50.0 Hairpin Tm: None Self Dimer Tm: 16.7 Tm: 58.5 created by: primer3</p>		

Secara umum, panjang primer ideal antara 18 sampai 30 oligonukleotida. Jika panjang primer kurang dari 18 basa, akan mudah menyebabkan terjadinya *mispripping* sehingga primer akan menempel pada tempat yang tidak diinginkan. Panjang primer lebih dari 30 basa akan menunjukkan spesifisitas rendah dan mengakibatkan terjadinya proses hibridasi dengan primer lain sehingga akan menghambat terbentuknya polimerasi DNA (Maitri dkk., 2016). Tabel 1 memperlihatkan panjang primer forward dan primer reverse masing-masing berukuran 20 bp yang artinya sudah memiliki panjang primer ideal sehingga dapat mengurangi terjadinya resiko *mispripping*.

Tm (*melting temperature*) merupakan suhu saat untai ganda DNA akan terpisah dan nilai *Tm* yang direkomendasikan berkisar antara 50- 65°C. Selisih *Tm* antara primer forward dan reverse yang paling baik adalah tidak lebih dari 5°. Apabila selisih lebih lebih 5° akan menyebabkan terjadinya penurunan efisiensi proses amplifikasi (Sasmito dkk., 2014). Sesuai kriteria primer pada Tabel 1 selisih *Tm* primer forward dan reverse tidak lebih dari 5° yakni hanya 1,1° sehingga baik untuk proses amplifikasi.

Persentase GC merupakan kandungan basa G (guanin) dan C (sitosin) yang dapat mempengaruhi *Tm* suatu primer dan ikatan antar untai pada DNA. Kandungan GC yang dianjurkan berkisar antara 40% sampai 60%. Kandungan GC tinggi akan mempersulit pemisahan rantai untai ganda pada primer dan DNA *template*. Suatu primer yang memiliki kandungan GC rendah tidak akan mampu untuk menempel secara efektif pada target sehingga akan terjadi penurunan efisiensi proses PCR (Handoyo & Ari, 2001).

Reaksi PCR seharusnya tidak mengandung *secondary structures* berupa hairpin dan dimer. *Secondary structures* mengakibatkan primer tidak dapat menempel dengan *template DNA*. *Hairpin* merupakan struktur yang dibangun oleh basa pendamping asam polinukleat antara urutan komplementer untai tunggal baik DNA ataupun RNA. *Hairpin* sebaiknya dihindari dalam mendesain primer, namun terkadang sangat sulit untuk memperoleh primer yang tidak membentuk struktur hairpin atau loop. Adapun *self dimer* terjadi apabila terbentuk ikatan pada dua primer yang sejenis (primer forward dengan primer forward atau primer reverse dengan primer reverse). *Self dimer* sebaiknya rendah bahkan tidak ada untuk hasil primer yang benar-benar ideal (Handoyo & Ari, 2001). Tabel 1 menunjukkan bahwa primer telah dirancang sesuai dengan persyaratan untuk memenuhi kriteria ideal.

Spesifisitas primer diperiksa ulang dengan Primer BLAST-tool pada NCBI. Hal ini bertujuan agar primer yang telah memenuhi kriteria ideal memang hanya akan mengamplifikasi *Shigella* sp. Tabel 2 memperlihatkan bagaimana spesifisitas primer yang telah dirancang.

Tabel 2. Uji Spesifisitas Primer menggunakan Primer BLAST

Target template	Primer Shigella F dan Shigella R
<i>Shigella flexneri</i>	Ya
<i>Shigella boydii</i>	Ya
<i>Shigella sonnei</i>	Ya*1
<i>Shigella dysenteriae</i>	Ya*1
<i>Escherichia coli</i>	Ya*1
<i>Salmonellatyphi</i>	Tidak
<i>Salmonella bongori</i>	Tidak
<i>Salmonella enterica</i>	Tidak
<i>Legionella pneumophila</i>	Tidak
<i>Vibrio cholerae</i>	Tidak

*jumlah ketidaksesuaian (*mismatch*) paling sedikit dengan urutan sekuen primer target

Dari tabel terlihat bahwa primer hanya akan mengamplifikasi *Shigella flexneri* dan *Shigella boydii*. Untuk *Shigella sonnei*, *Shigella dysenteriae* dan *Escherichia coli* juga memiliki urutan sekuen hampir sama, akan tetapi *mismatch* pada ujung 3' salah satu primer sehingga tetap tidak dapat teramplifikasi. Untuk ukuran primer umum 20 bp ketidakcocokan pada ujung 3' akan mempengaruhi suhu annealing sehingga template tidak menempel pada gen target (Simsek & Adnan, 2000).

PCR *in silico* dilakukan untuk pasangan primer tersebut dengan sekuen genom *Shigella* sp. (NC_004337.2) menggunakan software Geneious Prime (Gambar 3). Hasil PCR *in silico* menunjukkan pasangan primer tersebut dapat menempel pada sekuen genom *Shigella* sp. (NC_004337.2) pada nukleotida ke- 3.295.600 – 3.295.619 untuk primer Shigella F dan pada nukleotida ke- 3.296.395 - 3.296.414 untuk primer Shigella R. Pasangan primer ini akan mengamplifikasi daerah gen *yhbV* dan *yhbW* yang berada pada DNA kromosom, sehingga akan diperoleh ampikon berukuran 815 bp. Hasil ini konsisten dengan prediksi ukuran produk PCR dengan Primer BLAST. Kegunaan PCR *in silico* adalah untuk memprediksi dan mensimulasikan penempelan sekuen primer pada sekuen DNA *template*, sehingga dapat meminimalisir kesalahan pada saat melakukan PCR secara *in vitro*.



Gambar 3. PCR *in silico* dengan pasangan primer Shigella F dan Shigella R menggunakan Geneious Prime

Kesimpulan

Primer yang berhasil dirancang telah memenuhi syarat sebagai primer ideal untuk proses amplifikasi PCR. Desain primer yang dibuat secara *in silico* menghasilkan primer *forward* 5'-GCTAATGAAAATGGCGCTGT-3' dan primer *reverse* 5'-AGCCGACGGTTTGAAGTTAC-3'. Pasangan primer berhasil mengamplifikasi daerah gen *yhbV* dan *yhbW* dengan ukuran 815 bp sesuai dengan hasil analisis secara *in silico* yang dihasilkan pada Geneious Prime dan hasil BLAST pada NCBI.

Ucapan Terima Kasih

Terimakasih juga kepada orang tua serta keluarga teman-teman yang selalu mendukung melalui semangat dan doa.

Daftar Pustaka

- Atmiati, D.W. (2012). Faktor-faktor yang Berhubungan dengan Keberadaan Bakteri *Escherichia coli* pada Jajanan Es Buah yang Dijual di Sekitar Pusat Kota Temanggung. *Jurnal Kesehatan Masyarakat*, 1(2) : 1057-1053.
- Diss, T. (2003). *The Polymerase Chain Reaction: Molekular Biology in Cellular Pathology*. United Kingdom: John Willey and Sons, Ltd.
- Handoyo, Darmo & Ari Rudidetna. (2001). Prinsip Umum Dan Pelaksanaan Polymerase Chain Reaction (PCR). *Pusat Studi Bioteknologi*. 9 (1): 17-29.
- Herwana E, Surjawidjaja JE, Salim OCh, Indriani N., Bukitwetan P, Lesmana M. (2010). Shigella-associated Diarrhea in Children in Shout Jakarta, Indonesia. *Shoutheast Asian J Trop Med Public Health*. 41(2) : 418-425.
- Kearse Matthew, Richard M, Amy W, S Stones-Havas, M Cheung, S Sturrock, S Buxton, A Cooper, S Markowitz, C Duran, Tobias T, B Ashton, Peter M, and A Drummond. (2012). Geneious Basic: An integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics*. 28(12): 1647-1649.
- Maitri, L. K. B., I. N. Wirajana., S. C., Yowani. (2016). Desain Primer Untuk Amplifikasi Fragmen Gen Inha Isolat 134 Multidrug Resistance Tuberculosis (Mdr-Tb) Dengan Metode Polymerase Chain Reaction. *Cakra Kimia*. 3(2): 89-95.
- Muhsinin, S., Sulastri, M. M., & Dadih, S. (2018). Deteksi Cepat Gen *InvA* pada *Salmonella* spp. dengan Metode PCRm. *Jurnal Sains Farmasi & Klinis*. 5 (3): 23 - 26.
- Mullis, Kary.B, Francois Ferre, Richard A. Gibbs. (1994). *The Polymerase Chain Reactions*. New York: Springer
- Nuria, M. C., Rosyid, A., & Sumantri, S. (2009). Uji Kandungan Bakteri *Escherichia Coli* Pada Air Minum Isi Ulang dari Depot Air Minum Isi Ulang di Kabupaten Rembang. *Jurnal-Jurnal Ilmu Pertanian*. 5(1): 28 - 35.
- Parija, S.C. (2012). *Microbiology Immunology* 2nd Edition. India: Elsevier.
- Sari, D.A. Purnama. (2012). Isolasi dan Identifikasi *Salmonella enteridis* pada telur Saluran Pencernaan dan Feses Ayam Ras dari Peternakan di Gunung Sindur Bogor. *Skripsi*. Fakultas Peternakan, Intitut Pertanian Bogor.
- Sasmito DEK, Rahadian Kurniawan, Izzati Muhimmah. (2014). Penulisan Laporan Penelitian untuk Jurnal. *Makalah* disajikan dalam Seminar Nasional Informatika Medis (SNIMed) V 2014, Fakultas Teknologi Industri, Universitas Islam Indonesia, Sleman, 6 Desember.
- Simsek M & Adnan H. (2000). Effect of Single Mismatches at 3'-end of Primers on Polymerase Chain Reactions. *J Sci Res Med Sci*. 2(1) : 11-14.
- Venkatesan, M.M., B.B. Hartman, W.J. Newland, V.S. Isanova, T. Hale, M. McDonough, J. Butterson. (2012). Infection and Immunity : Construction, Characterization, and Animal testing of WRSdI, a *Shigella dysenteriae* I Vaccine. *American Society for Microbiology*. 70(6): 2950-2958.
- Xiong, J. (2006). *Essential Bioinformatics*. Cambridge: Cambridge University Press.