

Perancangan Primer Gen *IktB* pada *Fusobacterium necrophorum* untuk Analisis PCR

(Primer Design of *IktB* Gene on *Fusobacterium necrophorum* for PCR Assay)

Rian Ka Praja^{1*}, Reny Rosalina²

¹Ilmu Biomedik, Fakultas Kedokteran, Universitas Udayana, Jl. Sudirman, Sanglah, Denpasar, Bali, Indonesia 80234.

²Departemen Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Institut Teknologi Bandung, Jl. Ganesa No. 10, Bandung, Jawa Barat, Indonesia 40132.

ARTICLE INFO

Received: 18 Februari 2021

Accepted: 17 Mei 2021

*Corresponding author
riankapraja@gmail.com

Keywords:

Fusobacterium necrophorum

In silico

Leukotoxin B

Necrobacillosis

Primer

ABSTRACT

Fusobacterium necrophorum is a pathogen causing disease in animals, especially cattle, goats, and sheep. *F. necrophorum* infection can result in a variety of necrotic conditions (necrobacillosis). This study aimed to design a pair of primers for detecting the leukotoxin B (*IktB*) gene expressed by *F. necrophorum* as diagnostic support. The *IktB* gene sequence was obtained from GenBank NCBI with accession number AF312861.3:685-2337. Furthermore, the sequence was used as a template for in silico primer design using Primer-BLAST. Primer candidates successfully designed were then analyzed for their secondary structure using NetPrimer. The results showed that forward primer set 6 (5'-TCGGATGCTGGAATGCTACTT-3') and reverse primer set 6 (5'-GGGCTCCCAAATCCTTACGA-3') were a favorable primer set with a product size of 228 bp. However, laboratory experiments need to be carried out to determine the optimal conditions for this primer set.

ABSTRAK

Fusobacterium necrophorum merupakan patogen yang dapat menyebabkan penyakit pada berbagai hewan khususnya sapi, kambing, dan domba. Infeksi *F. necrophorum* dapat mengakibatkan berbagai kondisi nekrotik (nekrobasilosis). Penelitian ini bertujuan untuk mendesain primer untuk mendeteksi gen leukotoxin B (*IktB*) yang diekspresikan oleh *F. necrophorum* sebagai penunjang diagnosis. Urutan gen *IktB* diperoleh dari GenBank NCBI dengan nomor akses AF312861.3:685-2337. Selanjutnya urutan gen tersebut digunakan sebagai cetakan untuk desain primer secara in silico menggunakan Primer-BLAST. Kandidat primer yang telah berhasil didesain kemudian dianalisis struktur sekundernya menggunakan NetPrimer. Hasil penelitian menunjukkan bahwa primer forward 6 (5'-TCGGATGCTGGAATGCTACTT-3') dan primer reverse 6 (5'-GGGCTCCCAAATCCTTACGA-3') memenuhi syarat sebagai primer yang baik dengan ampikon berukuran 228 bp. Eksperimen lebih lanjut di laboratorium perlu dilakukan untuk menentukan kondisi optimal dari pasangan primer ini.

Kata Kunci:

Fusobacterium necrophorum

In silico

Leukotoksin B

Nekrobasilosis

Primer

1. Pendahuluan

Fusobacterium necrophorum menyebabkan berbagai kondisi nekrotik (nekrobasilosis), baik infeksi spesifik maupun non-spesifik, pada berbagai hewan. Laporan berbagai kasus menunjukkan bahwa abses hati dan penyakit kaki busuk (*foot rot*) menjadi perhatian penting bagi industri peternakan (Clifton, Giebel, Liu, Purdy, & Green, 2019; Saleh et al., 2019; Veloso & Drouillard, 2020). Mekanisme patogenesis infeksi *F. necrophorum* sangat kompleks. Beberapa toksin atau produk yang disekresikan, seperti *leukotoxin*, *endotoxin*, *hemolysin*, *hemagglutinin*, *protease*, dan *adhesin* telah dilaporkan sebagai faktor virulensi yang diekspresikan oleh *F. necrophorum* (Van Metre, 2017).

Leukotoxin merupakan faktor virulensi mayor yang diproduksi oleh *F. necrophorum*. (Pillai, Amachawadi, Baca, Narayanan, & Nagaraja, 2021). Urutan lengkap nukleotida dari *leukotoxin F. necrophorum* telah berhasil diidentifikasi. Protein *leukotoxin F. necrophorum* disandi oleh operon trisistronik yang terdiri dari *lktB*, *A*, dan *C* (Umana et al., 2019). Protein *lktA* telah diidentifikasi mampu menginduksi apoptosis dan nekrosis pada leukosit sapi (Pillai et al., 2021; Tadepalli, Stewart, Nagaraja, & Narayanan, 2008). Secara struktural, protein *lktB* memiliki domain POTRA_2 (*polypeptide transport-associated domain*) pada residu asam amino 85-160 dan domain Sh1B pada residu asam amino 172 – 549. Kedua domain ini terkait dengan *type Vb secretion system* yang memiliki fungsi biologis yang berhubungan dengan sistem transport dan sekresi toksin *lktA*. Sementara itu, fungsi biologis *lktC* masih belum diidentifikasi lebih lanjut (Tadepalli et al., 2008).

Terobosan dalam bidang biologi molekuler telah membawa kemajuan pesat di bidang veteriner. Teknik biologi molekuler seperti *polymerase chain reaction* (PCR) dapat digunakan untuk mendeteksi keberadaan gen yang berperan sebagai faktor virulensi pada suatu patogen. PCR yang bertujuan untuk mengamplifikasi DNA terdiri dari tiga tahap. Tahap awal dari proses amplifikasi adalah denaturasi untai DNA, kemudian pasangan primer menempel pada fragmen DNA target (*annealing*), dan tahap terakhir adalah proses perpanjangan urutan DNA (Kadri, 2020).

Primer oligonukleotida merupakan komponen yang sangat penting dalam teknik PCR. Primer yang baik adalah primer yang memiliki sifat spesifik yang diharapkan mampu mengamplifikasi area spesifik dalam genom (Praja, 2021; Sint, Raso, & Traugott, 2012). Seiring dengan perkembangan basis data

GenBank NCBI, desain primer kini dapat dilakukan dengan pendekatan *in silico*. Studi *in silico* adalah studi yang dilakukan menggunakan pendekatan komputasi. Secara umum, studi *in silico* memanfaatkan basis data yang tersedia untuk dijadikan objek penelitian (Saraswati, Seprianto, & Wahyuni, 2019). Penelitian ini bertujuan untuk merancang dan menganalisis primer oligonukleotida secara *in silico* untuk mengamplifikasi gen *lktB F. necrophorum*.

2. Materi dan Metode

2.1. Pencarian Urutan Gen *lktB F. necrophorum*

Urutan gen *lktB F. necrophorum* diperoleh menggunakan menu pencarian “*nucleotide*” yang disediakan oleh GenBank NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>).

Urutan gen *lktB F. necrophorum* yang digunakan pada penelitian ini adalah urutan dengan nomor akses AF312861.3:685-2337. Urutan gen *lktB* yang diperoleh kemudian disimpan ke dalam bentuk format FASTA untuk selanjutnya digunakan dalam proses desain primer secara *in silico*.

2.2. Desain Primer secara *In Silico*

Kandidat pasangan primer yang akan digunakan untuk mengamplifikasi gen *lktB* didesain menggunakan Primer-BLAST tool (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) dengan parameter tertentu (Tabel 1). Urutan gen dalam format FASTA yang berisi urutan gen *lktB* diunggah ke Primer-BLAST dan kemudian akan diperoleh beberapa pasangan primer yang memiliki potensi untuk mengamplifikasi gen *lktB*.

Tabel 1. Parameter yang digunakan pada Primer-BLAST

Parameter	Pengaturan
<i>PCR product size</i>	<i>Min:</i> 70 <i>Max:</i> 1000
<i># of primers to return</i>	10
<i>Primer melting temperatures (T_m)</i>	<i>Min:</i> 57.0 <i>Opt:</i> 60.0 <i>Max:</i> 63.0 <i>Max T_m difference:</i> 3

2.3. Analisis Struktur Sekunder

Seluruh pasangan primer yang telah didesain harus dianalisis struktur sekundernya untuk menemukan kandidat pasangan primer yang terbaik. Analisis struktur sekunder yang terdiri dari *self dimer*, *hairpin*, *repeat*, dan *run* dilakukan menggunakan aplikasi NetPrimer yang dapat diakses melalui

<http://www.premierbiosoft.com/NetPrimer/AnalyzePrimer.jsp>.

2.4. Uji Similaritas

Uji similaritas dilakukan untuk menguji apakah primer yang telah didesain mampu mengamplifikasi gen *lktB* secara spesifik. Uji ini dilakukan menggunakan fitur Nucleotide BLAST yang tersedia secara online pada <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>. Urutan primer nukleotida yang telah berhasil dirancang selanjutnya diunggah dan akan diperoleh nilai persentase kesamaan (*similarity*) dengan urutan

gen yang terdapat pada basis data GenBank NCBI.

3. Hasil dan Pembahasan

Studi *in silico* ini berfokus pada perancangan primer oligonukleotida menggunakan aplikasi Primer-BLAST untuk mengamplifikasi gen *lktB*. Urutan gen *lktB F. necrophorum* yang terdiri dari gen *lktB*, *A*, dan *C* diperoleh melalui GenBank NCBI dengan nomor akses AF312861.3. Penelitian ini secara spesifik hanya menggunakan daerah gen *lktB* (daerah 685-2337) dengan urutan seperti pada Gambar 1.

```

lktB ATG TTT CAT TTA AAA AAA GAA TTA AAA ACA TTT GTT TTT [ 723]
lktB TTT ATG TTG ATT TTA AGT TGC CCA AAT ATA TTG GCA GAA [ 762]
lktB GGA ATT CAA ACA TCC TCT ACA GAA TCG GAT GCT GGA ATG [ 801]
lktB CTA CTT GAT AGA AAC AAC AGG ATA TTT CAA CAA GGA AAA [ 840]
lktB TTA CAG AAG ATT TTG CAT TCT GAG AAA GAA AAA CGA AAA [ 879]
lktB CAA GGA ATT GAA AAT TTG GAG AAG AAA AAG GAA GAA GAT [ 918]
lktB ATC AAA GTA TCA GAT GTT TCT TTT TTA TTA AAA AAA TTG [ 957]
lktB GAG ATT CCA AAG TCT GAT ATT TTA ACA GAA GAA GAA ATC [ 996]
lktB GTA AGG ATT TGG GAG CCC TAT ATA GAA AAA GAA GTT ACC [1035]
lktB GTT GCA GAT CTT TAT ACT ATA GTT CAA AAA ATC AAT GAA [1074]
lktB TTA TAT CAG GAA AAA GGC TAT TTG GTT TGT CGT GCC GTA [1113]
lktB TTA CCT GCA CAA AAA ATT CAA AAT GGA CTT GTG AAT ATT [1152]
lktB TTA TTG ATA GAA GGA AAA ACA GGA GAT ATT ATA ATT CAA [1191]
lktB GGA AAT CAT TCC ACT CGA GAA AAA TAT ATC AGA GAA AGA [1230]
lktB ATT CCT TTA GAA AAA GAC AGA GTT TCG AAT TTT AAA GAA [1269]
lktB TTA GAT CGA AGT TTA ACA CGT TTT AAT CTT ACA AAT GAC [1308]
lktB AGT CCT ATA CAG ATC AAT ATG GCT TCC GGA AAA GTT CCG [1374]
lktB GGA ACG ACC GAT TAT TTT GTG CAA ATC TAT GAA CCA AAA [1386]
lktB AGA CAG CAG TTT TTT GTT TTT GCA GAT AAT TTA GGA CAA [1425]
lktB AAA AAT ACA GGA GAA TTA CGA TGG GGG CTA AAT TAT ATT [1464]
lktB AAT AAT AGT GTT ACA GGA AAC AGA GAT CAA CTG TCT CTT [1503]
lktB ACC TCT TTA GTA ACA GAA GGA ACG GCT TCT CTA TCT TCT [1542]
lktB TTT TAT ACT TTT CCT GTT TCT AAA AAA GGA ACC AAA ATA [1581]
lktB TCA CTA CAA CAT TCT GTA GGA AAG TTG AAA CAT ATA CAA [1620]
lktB GGG GCT TTA AAG CAT AAA ATA ACT GGA AAC TCT TAT AGT [1659]
lktB TAT GGG GTT GGA ATA GTT CAT CCT ATT CTG GTT CAT GAA [1698]
lktB AAA AAT AAA GTA GAA CTT TCC TTG GAT TGG GTA AAA CAA [1737]
lktB AGG ACT GTT ACA GAT CTA TTG AAA TTG AAA TGG GTA AAT [1776]
lktB AAT AGA CTT TCT AAG TAT ACA GCG GGA ATT GGA ATA AGC [1815]
lktB CAT TAT GAG GAA GAT AGT GTT TTC TAT ACA AAG CAA AAT [1854]
lktB ATT ACA AAG GGA AAA TTT ATT CCA ATT TCG GGA GAT GCA [1893]
lktB AGA AAT TAT ACA AAG TAT GAT ATG TTT CTA ATA TAT CAG [1932]
lktB AAA AAC TTG AAA TAT AAC ACT TTA GTA ACA CTA AAG ATG [1971]
lktB GCA GGG CAA TAT TCT CTG AGT AAA AAA TTA CCC TCT GTC [2010]
lktB GAG CAA ATT TAT GCA GGA GGA GCC TAT AAT GTT CGT GGT [2049]
lktB TAT CCG GAA AAT TTT ATG GGA GCT GAA CAC GGA GTT TTT [2088]
lktB TTC AAT GCT GAA TTA TCA AAA TTA GTA GAG AAT AAA GGA [2127]
lktB GAA TTT TTT GTT TTT TTA GAT GGG GCT TCT CTT CAT GGA [2166]
lktB GAG AGT GCT TGG CAG GAA AAT AGA ATT TTT AGC TCA GGT [2205]
lktB TTT GGA TAT AAA ATA AGG TTT TTA GAA AAA AAT AAT ATT [2244]
lktB GCT GTT AGC ATG GCA TTT CCA TGG AAG AAA AAA ATA AAT [2283]
lktB AGT ATT TCA GTA GAT TCT AAT CGA ATC TAT ATT ACA ATA [2322]
lktB AAT CAT GAA TTT TAA [2337]
    
```

Gambar 1. Urutan nukleotida gen *lktB F. necrophorum*. Gen *lktB* memiliki susunan nukleotida dengan panjang 1653 bp yang diperoleh dari GenBank NCBI dengan nomor akses AF312861.3:685-2337.

Perangkat lunak Primer-BLAST menghasilkan sepuluh pasang kandidat primer untuk mengamplifikasi gen *lktB F. necrophorum* di daerah 685-2337 dari urutan DNA lengkap gen penyandi *leukotoxin* (Gambar 1). Sepuluh pasang primer yang dirancang oleh Primer-BLAST menunjukkan keragaman terkait ukuran produk

PCR, panjang primer, *T_m*, dan persentase GC (Tabel 2). Produk terpendek dan terpanjang dihasilkan oleh pasangan primer 9 dan 3 dengan masing-masing 105 dan 751 bp (Gambar 2). Selanjutnya suhu leleh (*T_m*) dari masing-masing pasangan primer memiliki perbedaan tidak

melebihi 5 °C dengan temperatur berkisar 59,23-60,89 °C.

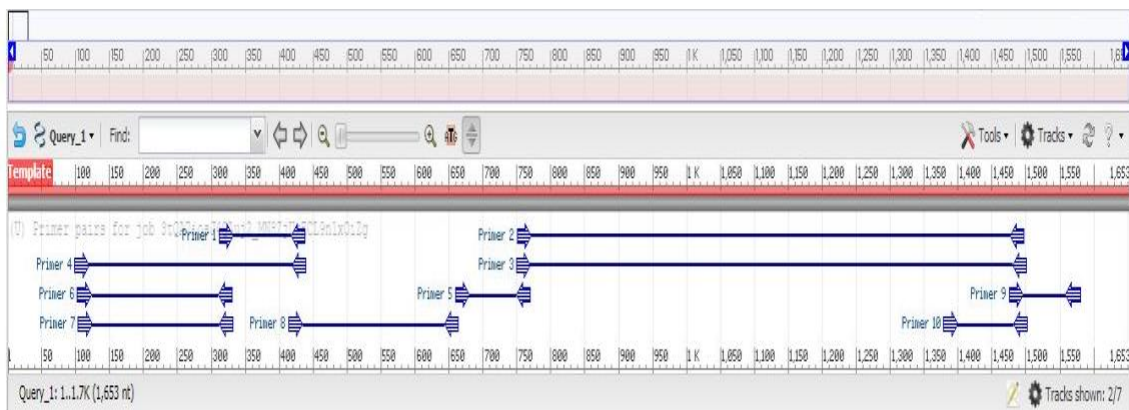
Urutan primer oligonukleotida yang diperoleh dari Primer-BLAST kemudian dianalisis lebih lanjut untuk mengidentifikasi primer yang paling efisien. Analisis untuk mengidentifikasi *self dimer*, *hairpin*, *repeat*, dan *run* dilakukan menggunakan NetPrimer. Semua primer yang dianalisis menunjukkan hasil yang

bervariasi dalam hal *self dimer*, *hairpin*, *repeat* dan *run*. Selain itu, NetPrimer juga memberikan penilaian (*rating*) terkait kualitas primer. Kisaran *rating* primer yang telah didesain berkisar 62 sampai 100 dan pasangan primer 6 adalah pasangan primer dengan *rating* tertinggi di antara semua primer yang didesain menggunakan Primer-BLAST (Tabel 3).

Tabel 2. Kandidat primer untuk mengamplifikasi gen *lktB* yang didesain menggunakan Primer-BLAST

Urutan (5'->3')	Panjang	Tm	GC %	Panjang Produk (bp)
Pasangan Primer 1 F: CGTAAGGATTTGGGAGCCCT R: GCAGGTAATACGGCACGACA	20 20	59,45 60,46	55,00 55,00	126
Pasangan Primer 2 F: GGAGAATTACGATGGGGGCT R: CTGCCAAGCACTCTCTCCAT	20 20	59,23 59,75	55,00 55,00	747
Pasangan Primer 3 F: AGGAGAATTACGATGGGGGC R: TTCCTGCCAAGCACTCTCTC	20 20	59,23 59,68	55,00 55,00	751
Pasangan Primer 4 F: GAATCGGATGCTGGAATGCT R: GTGCAGGTAATACGGCACGA	21 20	59,86 60,46	47,62 55,00	341
Pasangan Primer 5 F: TCCGGGAACGACCGATTATT R: GCCCCATCGTAATTCTCCT	20 20	58,89 59,23	50,00 55,00	110
Pasangan Primer 6 F: TCGGATGCTGGAATGCTACTT R: GGGCTCCCAAATCCTTACGA	21 20	59,51 59,46	47,62 55,00	228
Pasangan Primer 7 F: CGGATGCTGGAATGCTACTTG R: AGGGCTCCCAAATCCTTACG	21 20	59,40 59,45	52,38 55,00	228
Pasangan Primer 8 F: GGTGGTCGTGCCGTATTACC R: CGGAACCTTTCCGGAAGCCA	21 20	59,61 60,89	52,38 55,00	250
Pasangan Primer 9 F: TCATGGAGAGAGTGCTTGGC R: GAAATGCCATGCTAACAGCAA	20 22	59,75 60,09	55,00 45,45	105
Pasangan Primer 10 F: TTATGGGAGCTGAACACGGAG R: TTTTCCTGCCAAGCACTCTCT	21 21	59,79 59,86	52,38 47,62	124

Keterangan: F = primer *forward*; R = primer *reverse*, Tm = suhu leleh, GC % = persentase basa GC



Gambar 2. Ilustrasi daerah yang diamplifikasi oleh setiap pasangan primer. Sepuluh pasang kandidat primer mampu mengenali wilayah gen *lktB* dengan panjang produk yang bervariasi.

Tabel 3. Hasil analisis struktur sekunder menggunakan NetPrimer

Urutan (5'→3')	<i>Self Dimer</i>	<i>Hairpin</i>	<i>Repeat</i> (# of pairs)	<i>Run</i> (# of bases)	<i>Rating</i>
Pasangan Primer 1					
F: CGTAAGGATTTGGGAGCCCT	2	1	-	3	85
R: GCAGGTAATACGGCACGACA	-	-	-	-	100
Pasangan Primer 2					
F: GGAGAATTACGATGGGGGCT	1	-	-	5	90
R: CTGCCAAGCACTCTCTCCAT	-	-	3	-	100
Pasangan Primer 3					
F: AGGAGAATTACGATGGGGGC	1	-	-	5	90
R: TTCCTGCCAAGCACTCTCTC	-	-	3	-	100
Pasangan Primer 4					
F: GAATCGGATGCTGGAATGCT	-	-	-	-	100
R: GTGCAGGTAATACGGCACGA	2	1	-	-	82
Pasangan Primer 5					
F: TCCGGGAACGACCGATTATT	1	1	-	3	79
R: GCCCCATCGTAATTCTCCT	1	-	-	5	90
Pasangan Primer 6					
F: TCGGATGCTGGAATGCTACTT	-	-	-	-	100
R: GGGCTCCCAAATCCTTACGA	-	-	-	3	100
Pasangan Primer 7					
F: CGGATGCTGGAATGCTACTTG	-	-	-	-	100
R: AGGGCTCCCAAATCCTTACG	-	1	-	3	99
Pasangan Primer 8					
F: GGTTTGTCTGCGCCGATTACC	2	-	-	3	90
R: CGGAACTTTTCCGGAAGCCA	3	2	-	4	62
Pasangan Primer 9					
F: TCATGGAGAGAGTGCTTGGC	1	-	3	-	90
R: GAAATGCCATGCTAACAGCAA	3	2	-	3	82
Pasangan Primer 10					
F: TTATGGGAGCTGAACACGGAG	1	-	-	3	88
R: TTTCTGCCAAGCACTCTCT	-	-	3	4	100

Keterangan: F = *Forward*; R = *Reverse*.

Perancangan primer merupakan langkah awal yang menentukan performa amplifikasi dari sebuah proses uji PCR (Prajna, 2021). Beberapa hal yang harus diperhatikan dalam mendesain primer yaitu panjang primer, suhu leleh, persentase GC serta kriteria lainnya yaitu jumlah *self dimer*, *hairpin*, *repeat*, and *run* yang rendah (Pradnyaniti, Wirajana, & Yowani, 2013; Saraswati et al., 2019).

Pada penelitian ini, seluruh primer yang telah didesain menunjukkan panjang berkisar 20 – 21 basa (Tabel 2). Secara teoritis, primer dengan panjang 18-30 basa merupakan panjang primer yang ideal (Sasmito, Kurniawan, & Muhimmah, 2014). Primer PCR yang terlalu pendek akan cenderung mengalami *mispriming* (kesalahan penempelan) dan primer yang terlalu panjang memiliki potensi untuk terjadinya hibridisasi sehingga akan menghambat proses polimerisasi DNA (Anika, Putri, & Wahyuni, 2019).

Seluruh primer yang telah berhasil didesain pada penelitian ini memiliki persentase GC berkisar 45,45 hingga 55 % (Tabel 2). Persentase GC merupakan faktor penting dalam mendesain primer PCR. Persentase GC adalah jumlah basa

guanin dan sitosin dalam suatu primer yang nantinya terkait dengan suhu leleh. Selain itu, persentase GC juga terkait dengan ikatan antar utas DNA. Untuk memutuskan ikatan hidrogen GC, dibutuhkan energi dan suhu yang lebih tinggi dibandingkan dengan AT. Dengan demikian, tingginya kandungan GC akan mempersulit pemutusan rantai utas ganda pada primer dan cetakan. Lebih lanjut, kandungan GC yang rendah pada primer menyebabkan primer tidak mampu menempel dan akan berdampak terhadap penurunan efisiensi PCR. Idealnya, persentase kandungan GC berada pada kisaran 40 – 60 % (Maitriani, Wirajana, & Yowani, 2015; Sasmito et al., 2014).

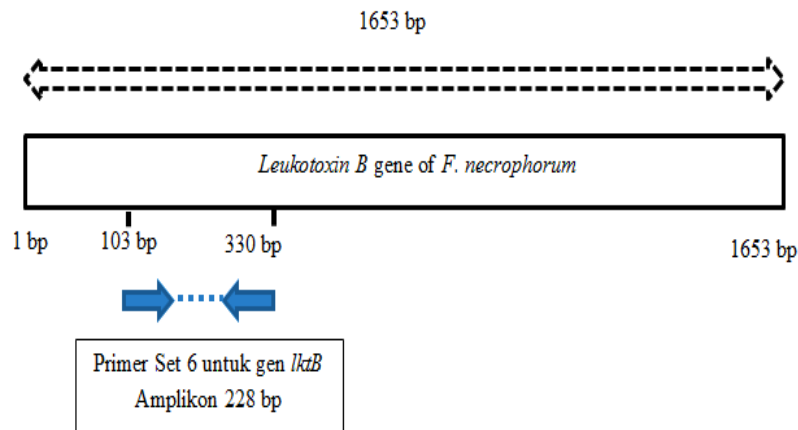
Secara umum, selisih suhu leleh dari seluruh pasangan primer yang didesain tidak melebihi 5 °C (Tabel 2). Suhu leleh sangat penting dalam menentukan proses denaturasi untai ganda DNA. Primer dengan suhu leleh yang terlalu tinggi (lebih dari 70 °C) cenderung mengalami *mispriming* pada suhu rendah dan primer yang memiliki suhu leleh rendah tidak akan dapat bekerja pada suhu tinggi (Anika et al., 2019). Oleh sebab itu, pasangan primer sebaiknya tidak memiliki selisih suhu leleh yang

tinggi. Pasangan primer dengan selisih suhu leleh yang lebih dari 5 °C antara primer *forward* dan *reverse* menyebabkan penurunan proses amplifikasi atau bahkan memungkinkan tidak terjadinya proses amplifikasi (Sasmito et al., 2014).

Hasil analisis struktur sekunder menunjukkan hasil yang bervariasi pada setiap pasangan primer (Tabel 3). Primer yang dapat berkomplemen dengan primer lainnya yang sejenis dikenal dengan istilah *self-dimer* (Sasmito et al., 2014). Keberadaan *self-dimer* selanjutnya akan mengarah pada penurunan efisiensi proses PCR. *Run* adalah pengulangan urutan satu basa yang sama, misal (AAA) pada primer *reverse* 9 (Tabel 2 dan 3). *Repeat* merupakan pengulangan dua basa yang sama, misal (GAGAGA) yang terdapat pada primer *forward* 9 (Tabel 2 dan 3). Keberadaan *run* dan *repeat* pada urutan primer dapat menyebabkan *mispriming* pada proses PCR. Secara umum, *run* dan *repeat* yang ditoleransi maksimal berjumlah empat (Sasmitha, Yustiantara, & Yowani, 2018; Sasmito et al., 2014). Faktor lain yang harus diperhatikan adalah *hairpin*. *Hairpin* merupakan kondisi dimana ujung-ujung dari primer saling berkomplemen. Keberadaan interaksi *hairpin* tidak dapat ditoleransi dalam proses desain primer (Sasmitha et al., 2018).

Secara umum, pada penelitian ini diperoleh beberapa pasangan primer dengan panjang

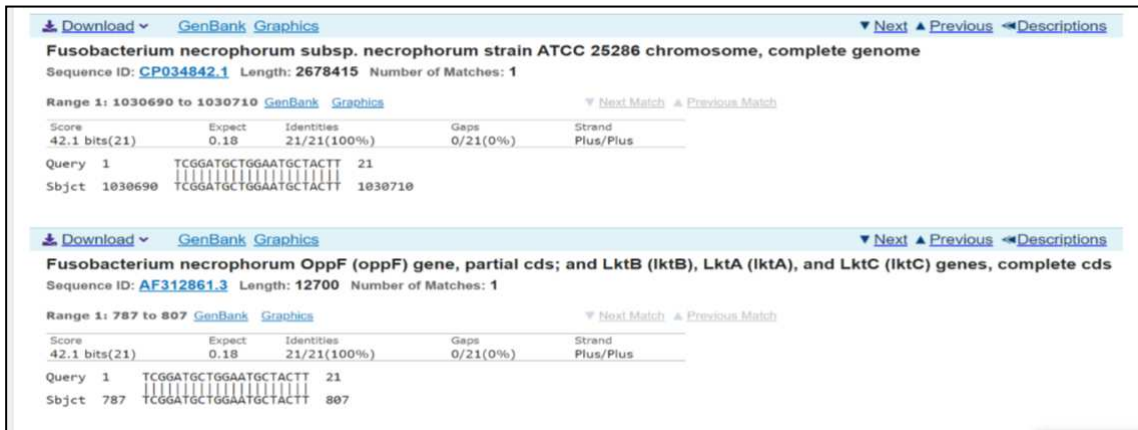
produk yang bervariasi (Tabel 2 dan Gambar 2). Primer dengan produk yang terpendek dan terpanjang secara berturut-turut dihasilkan oleh pasangan primer 9 dan 3 dengan panjang produk 105 dan 751 bp atau sekitar 7 dan 44 % dari total gen *lktB*. Secara spesifik, hasil analisis dari primer *forward* 6 (5'-TCGGATGCTGGAATGCTACT T-3') dan primer *reverse* 6 (5'-GGGCTCCCAA TCCTTACGA-3') menunjukkan ukuran ampikon sebesar 228 bp yang mengamplifikasi daerah 103-330 dari gen *lktB F. necrophorum* (Tabel 2 dan Gambar 3). Meskipun pasangan primer 6 hanya mengamplifikasi daerah dengan ukuran sekitar 14 % dari total ukuran *lktB* (Gambar 3), namun hasil analisis lebih lanjut menunjukkan bahwa pasangan primer 6 merupakan pasangan primer terbaik yang dapat mengamplifikasi gen target karena memenuhi kriteria ideal. Pasangan primer ini memiliki selisih Tm yang sangat kecil yaitu 0,05 °C, persentase GC sebesar 47,62 dan 55,00 %, serta tidak memiliki *self dimer*, *hairpin*, dan *repeat*. Primer ini teridentifikasi tidak memiliki *run* pada primer *forward* tetapi memiliki tiga *run* pada primer *reverse*. Lebih lanjut, hasil analisis menggunakan NetPrimer menunjukkan bahwa pasangan primer ini memiliki nilai atau *rating* tertinggi dengan nilai 100 dibandingkan dengan primer lainnya (Tabel 2 dan 3).



Gambar 3. Posisi relatif dari pasangan primer 6. Pasangan primer ini mengamplifikasi daerah 103 – 330 dari gen *lktB F. necrophorum* (Nomor akses GenBank NCBI: AF312861.3:685-2337).

Uji terkait similaritas dari pasangan primer 6 dilakukan menggunakan Nucleotide BLAST yang tersedia di dalam situs GenBank NCBI. Hasil analisis pada primer *forward* 6 menunjukkan bahwa primer ini memiliki kemiripan sebesar 100 % dengan gen *lktB* yang

terdapat pada *F. necrophorum* (Nomor akses CP033837.1, CP034842.1, dan AF312861.3). Lebih lanjut, primer *forward* 6 juga memiliki kesamaan yang lebih rendah berkisar 85 % dengan berbagai gen yang terdapat pada organisme lain (Gambar 4 dan Tabel 4).



Gambar 4. Representasi hasil Nucleotide BLAST dari primer *forward* 6. Urutan nukleotida primer *forward* 6 memiliki kemiripan sebesar 100 % dengan *F. necrophorum*

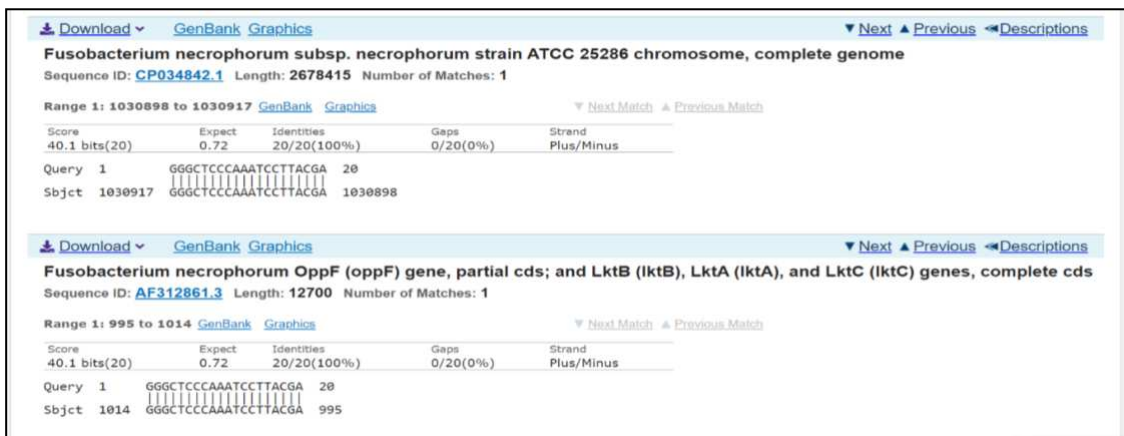
Tabel 4. Hasil Nucleotide BLAST pada primer *forward* 6

Deskripsi	Kesamaan	Nomor Akses
<i>Fusobacterium necrophorum</i>	100%	CP033837.1
<i>Fusobacterium necrophorum subsp. necrophorum</i>	100%	CP034842.1
<i>Fusobacterium necrophorum</i>	100%	AF312861.3
<i>Quercus lobata</i>	85%	XM 031087424.1
<i>Sparus aurata</i>	85%	LR537141.1
<i>Lateolabrax maculatus</i>	85%	CP032587.1
<i>Ochroleuca plecta</i>	85%	FR997738.1
<i>Xestia xanthographa</i>	85%	LR990644.1
<i>Darwinula stevensoni</i>	85%	LR899613.1
<i>Chiroxiphia lanceolata</i>	85%	XM 032703373.1

Keterangan: Data yang ditampilkan merupakan 10 organisme dengan gen yang memiliki kemiripan tertinggi dengan primer *forward* 6. Data dianalisis pada tanggal 15 Mei 2021.

Uji similaritas pada primer *reverse* 6 juga menunjukkan hasil kemiripan sebesar 100 % dengan gen *lktB* yang dimiliki oleh *F. necrophorum* dengan nomor akses CP033837.1, CP034842.1, dan AF312861.3. Kesamaan yang lebih rendah diperoleh pada berbagai gen dari organisme lain dengan nilai kemiripan berkisar 90 – 95 % (Gambar 5 dan Tabel 5). Berdasarkan uji

similaritas ini, dapat diperkirakan bahwa pasangan primer 6 merupakan primer yang sangat spesifik untuk mengamplifikasi gen *lktB* *F. necrophorum* karena pasangan primer 6 baik *forward* dan *reverse* hanya memiliki kemiripan 100 % dengan *lktB* *F. necrophorum*.



Gambar 5. Representasi hasil Nucleotide BLAST dari primer *reverse* 6. Urutan nukleotida primer *reverse* 6 memiliki kemiripan sebesar 100 % dengan *F. necrophorum*.

Tabel 5. Hasil Nucleotide BLAST pada primer *reverse 6*

Deskripsi	Kesamaan	Nomor Akses
<i>Fusobacterium necrophorum</i>	100%	CP033837.1
<i>Fusobacterium necrophorum subsp. necrophorum</i>	100%	CP034842.1
<i>Fusobacterium necrophorum</i>	100%	AF312861.3
<i>Apteryx mantelli mantelli</i>	95%	LK064839.1
<i>Exophiala dermatitidis</i> NIH/UT8656	95%	XM_009154451.1
<i>Bombus hortorum</i>	95%	HG995201.1
<i>Maniola hyperantus</i>	90%	LR761660.1
<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	90%	CP017637.1
<i>Acetobacter ascendens</i>	90%	CP015164.1
<i>Autographa pulchrina</i>	90%	FR997766.1

Keterangan: Data yang ditampilkan merupakan 10 organisme dengan gen yang memiliki kemiripan tertinggi dengan primer *reverse 6*. Data dianalisis pada tanggal 15 Mei 2021.

Primer yang dirancang menggunakan studi *in silico* idealnya harus dioptimasi di tingkat laboratorium untuk memperoleh kondisi yang optimal. Optimasi yang harus dilakukan meliputi *annealing temperature* (Ta) dan konsentrasi primer serta batas minimum yang mampu dideteksi. Berbagai optimasi lab tersebut dilakukan untuk mencapai hasil PCR yang optimal (Saraswati et al., 2019).

4. Kesimpulan

Pasangan primer yang spesifik untuk amplifikasi gen *lktB F. necrophorum* telah berhasil didesain. Pasangan primer 6 merupakan pasangan primer yang terbaik berdasarkan analisis *in silico*. Primer ini telah berhasil memenuhi persyaratan utama sebagai primer yang baik dalam hal panjang primer, suhu leleh, dan persentase GC dengan ampikon 228 bp. Sebagai tambahan, optimasi laboratorium perlu dilakukan untuk memperoleh kondisi optimal dari pasangan primer ini dan memastikan pasangan primer ini dapat mengamplifikasi gen *lktB* dengan baik.

Daftar Pustaka

Anika, M., Putri, D. H., & Wahyuni. (2019). Primer design for identification of beta-carotene encoding genes in cassava. *Bio Sains*, 4(1), 39–47.

Clifton, R., Giebel, K., Liu, N. L. B. H., Purdy, K. J., & Green, L. E. (2019). Sites of persistence of *Fusobacterium necrophorum* and *Dichelobacter nodosus*: a paradigm shift in understanding the epidemiology of footrot in sheep. *Scientific Reports*, 9(14429), 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-50822-9>

Kadri, K. (2020). Polymerase Chain Reaction (PCR): Principle and Applications. In M. L. Nagpal, O.-M. Boldura, C. Balta, & S.

Enany (Eds.), *Synthetic Biology-New Interdisciplinary Science* (pp. 147–164). London: IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.88813>

- Maitriani, L. K. B., Wirajana, I. N., & Yowani, S. C. (2015). Desain primer untuk amplifikasi fragmen gen *inhA* isolat 134 multidrug resistance tuberculosis (MDR-TB) dengan metode polymerase chain reaction. *Cakra Kimia (Indonesian E-Journal of Applied Chemistry)*, 3(2), 89–96.
- Pillai, D. K., Amachawadi, R. G., Baca, G., Narayanan, S. K., & Nagaraja, T. G. (2021). Leukotoxin production by *Fusobacterium necrophorum* strains in relation to severity of liver abscesses in cattle. *Anaerobe*, 69(102344). <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2021.102344>
- Pradnyaniti, D. G., Wirajana, I. N., & Yowani, S. C. (2013). Desain primer secara *in silico* untuk amplifikasi fragmen gen *rpoB* *Mycobacterium tuberculosis* dengan polymerase chain reaction (PCR). *Jurnal Farmasi Udayana*, 124–129.
- Prajna, R. K. (2021). *In silico* oligonucleotide primer design for *Campylobacter jejuni* cytolethal distending toxin B gene amplification. *Oceana Biomedicina Journal*, 4(1), 53–65. <https://doi.org/10.30649/OBJ.V4I1.88>
- Saleh, W. M. M., Naji, H. A., Lafta, M. H., Al-Husseiny, S. H., Abood, F. A., & Yassir, S. K. (2019). Clinical and bacteriological diagnosis of foot-rot in beef bulls in Basra. *Biomedical: Journal of Science & Technical Research*, 13(5), 1–5. <https://doi.org/10.26717/BJSTR.2019.13.002472>
- Saraswati, H., Seprianto, & Wahyuni, F. D. (2019). Desain primer secara *in silico* untuk amplifikasi gen *cryIII* dari *Bacillus*

- thuringiensis isolat lokal. *Indonesian Journal of Biotechnology and Biodiversity*, 3(1), 33–38.
- Sasmitha, L. V., Yustiantara, P. S., & Yowani, S. C. (2018). Desain DNA primer secara in silico sebagai pendeteksi mutasi gen *gyrA* *Mycobacterium tuberculosis* untuk metode polymerase chain reaction. *Cakra Kimia (Indonesian E-Journal of Applied Chemistry)*, 8(1), 63–69.
- Sasmito, D. E. K., Kurniawan, R., & Muhimmah, I. (2014). Karakteristik primer pada polymerase chain reaction (PCR) untuk sekuensing DNA: mini review. *Seminar Nasional Informatika Medis (SNIMed) V*, (5), 93–102. Magister Teknik Informatika, Fakultas Teknologi Industri, Universitas Islam Indonesia.
- Sint, D., Raso, L., & Traugott, M. (2012). Advances in multiplex PCR: balancing primer efficiencies and improving detection success. *Methods in Ecology and Evolution*, 3(5), 898–905. <https://doi.org/10.1111/j.2041-210X.2012.00215.x>
- Tadepalli, S., Stewart, G. C., Nagaraja, T. G., & Narayanan, S. K. (2008). Leukotoxin operon and differential expressions of the leukotoxin gene in bovine *Fusobacterium necrophorum* subspecies. *Anaerobe*, 14(1), 13–18. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2007.09.001>
- Umana, A., Sanders, B. E., Yoo, C. C., Casasanta, M. A., Udayasuryan, B., Verbridge, S. S., & Slade, D. J. (2019). Reevaluating the *Fusobacterium* virulence factor landscape. *BioRxiv*, 1–35. <https://doi.org/10.1101/534297>
- Van Metre, D. C. (2017). Pathogenesis and treatment of bovine foot rot. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, 33(2), 183–194. <https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2017.02.003>
- Veloso, V. A., & Drouillard, J. S. (2020). On the potential role of dietary lysine as a contributing factor in development of liver abscesses in cattle. *Frontiers in Veterinary Science*, 7, 1–4. <https://doi.org/10.3389/fvets.2020.576647>